

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 353**

51 Int. Cl.:

C12C 5/00 (2006.01)

C12C 7/00 (2006.01)

C12C 11/00 (2006.01)

C12N 9/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008** **E 08858987 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015** **EP 2222831**

54 Título: **Proceso de elaboración de cerveza**

30 Prioridad:

12.12.2007 US 12988 P

12.12.2007 WO PCT/US2007/008720

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.08.2015

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

KROGSHÖJVEJ 36

2880 BAGSVAERD, DK

72 Inventor/es:

ELVIG, NIELS

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 542 353 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso de elaboración de cerveza

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador. La forma legible por ordenador está incorporada aquí por referencia.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

10

[0002] La invención se refiere a un procedimiento para la producción de un mosto de cerveza, que incluye un tratamiento enzimático de una molienda que comprende hasta 100% de la forma (en grano) no malteada, y además se refiere al mosto obtenible por el proceso.

15

[0003] La invención además se refiere al uso de dicho mosto para el tratamiento adicional en productos de bebida de alta calidad y se refiere a un proceso para la producción de una cerveza o producto de cerveza de alta calidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

[0004] La maceración es el proceso de convertir el almidón de la malta de cebada molida y adjuntos en azúcares fermentables y no fermentables para producir mosto de la composición deseada. La maceración tradicional implica mezclar la malta de cebada molida y adjuntos con agua a una temperatura y volumen establecidos para continuar los cambios bioquímicos iniciados durante el proceso de malteado. El proceso de maceración se realiza en un periodo de tiempo a varias temperaturas para activar las enzimas endógenas responsables de la degradación de proteínas y carbohidratos. Después del proceso de maceración, el macerado se filtra para obtener el mosto para la fermentación de cerveza. Generalmente, la cerveza ha sido fermentada de cebada malteada, lúpulos, levadura y agua. Cereales de malteado tales como la cebada activan las enzimas endógenas necesarias para la degradación del almidón. No obstante, el proceso de malteado requiere mucha energía y tiempo y por lo tanto es más bien costoso. Así, una manera de reducir costes es sustituir parte de la malta con adjuntos fácilmente disponibles tales como almidón refinado o carbohidratos fácilmente fermentables y/o sustitución con cereales no malteados, tal como cebada, maíz, arroz, sorgo, y trigo. No obstante, cereales no malteados carecen de enzimas endógenas, que pueden resultar en la sacarificación incompleta, viscosidad del macerado/mosto aumentada, dificultades de filtración, fermentabilidad pobre, dificultades de filtración de cerveza, inestabilidad coloidal y sabor pobre. Enzimas exógenas tales como alfa-amilasa y β -glucanasa han sido previamente añadidas para compensar las enzimas carentes de malta. El siguiente estado de la técnica describe la sustitución de parte de los cereales malteados con cereales no malteados y enzimas añadidas exógenamente.

35

[0005] ZA9803237 describe un proceso para producir una cerveza por fermentación de un mosto obtenido de cebada parcialmente no malteada y una mezcla enzimática de alfa-amilasa, β -glucanasa y proteínasa. Wieg et.al. Process Biochemistry, 1970 también describen un proceso para elaboración de cerveza con una mezcla de cebada malteada y no malteada y una mezcla enzimática de alfa-amilasa, β -glucanasa y proteínasa. Además WO04/011591 describe un proceso para producir un mosto añadiendo una proteasa y una celulasa a un macerado de cebada malteada y no malteada. Un resumen de elaboración de cebada se da por Wieg et.al. Brewing science, 1987.

40

[0006] Otra vía para producir mosto es conocida de las cervezas japonesas Happsoshu. En Japón, las tasas sobre las bebidas alcohólicas que contienen malta son relativamente altas, razón por la cual las cervezas Happsoshu se fermentan con tan poco como 25% de cebada malteada. Normalmente, el macerado preparado en un contenido tan bajo de malta es imposible de filtrar para obtener el mosto, ya que el macerado es demasiado espeso para su filtración. Hay solo pocas descripciones técnicas disponibles en lo que se refiere a la composición del macerado de Happsoshu. No obstante, es conocido que es preciso añadir enzimas exógenas a la trituración para obtener filtrabilidad, por ejemplo proteinasas, β -glucanasa y amilasas. Las cervezas Happsoshu tienen características de sabor diferentes incluso en comparación con cervezas tradicionales del tipo lager más sencillas. JP 2004173533 describe la producción de tal cerveza con el uso de cebada prensada y cantidad inferior de malta. Enzimas diferentes se utilizan para ayudar por ejemplo a la sacarificación.

45

50

55

[0007] El mosto obtenido en las referencias del estado de la técnica se basan en molienda que comprende una cantidad considerable de malta. La composición enzimática en cereales crudos es sustancialmente diferente de cereales malteados y las enzimas endógenas y exógenas implicadas en la degradación de almidón están trabajando juntas en una manera compleja durante la maceración y está generalmente asumido que algo de malta debería estar presente en la molienda. Así incluso con enzimas añadidas exógenamente todavía existen algunos de los problemas anteriormente mencionados por ejemplo con la filtrabilidad, fermentabilidad y turbidez de mostos basados en cereales no malteados. En consecuencia, muy pocos intentos se han hecho para sustituir la mayor cantidad o todos los cereales malteados por cereales no malteados.

60

65

[0008] Un ejemplo es Goode et.al. que describen la producción de un mosto a partir del 100 % de sustrato de cebada crudo y una mezcla enzimática de dos alfa-amilasas diferentes y una beta-glucanasa. La alfa amilasa tiene un efecto positivo en la separación del macerado, pero la velocidad de filtración cayó cuando altas cantidades de cebada no

malteada estaban presentes. También en US 3081172 la producción de un mosto a partir de materia prima no malteada es sugerida no obstante no se menciona nada acerca de FAN (amino nitrógeno libre), la cantidad de azúcares fermentables y otros parámetros cruciales del mosto resultante.

5 [0009] En consecuencia, problemas tales como la baja fermentabilidad, composición de aminoácidos no óptima y alta viscosidad y turbidez del mosto no son resueltos y estos obstáculos tienden a aumentar con cantidades en aumento de cereales no malteados.

10 [0010] Otras desventajas con la elaboración de cerveza del estado de la técnica con cereales no malteados es que un tiempo de trituración prolongado se puede necesitar para que las enzimas exógenas y endógenas en la trituración produzcan un mosto que es comparable por ejemplo con respecto a la fermentabilidad a un mosto producido a partir de cereales malteados. El tiempo de trituración prolongado es claramente antieconómico y puede neutralizar las ventajas económicas de substituir cereales malteados con cereales no malteados.

15 [0011] Así hasta ahora ninguna mezcla enzimática ha compensado completamente las enzimas de malta, de manera que cuando se adicionan juntas con hasta 100 % de cereales no malteados podrían substituir completamente una molienda basada en cereales malteados.

20 [0012] Así aunque la producción de mosto a partir de cebada ha sido intentada desde el año 1960 ningún proceso real de elaboración de cerveza basado en materias primas de alta cantidad de cereales no malteados ha sido desarrollado.

25 [0013] Ante el deseo de reducir los costes relacionados con el malteado de cereales, y además obtener un mosto adecuado para producir una cerveza comparable en cuanto a las características de sabor al de las cervezas tradicionales, existe una necesidad de un método para obtener una trituración basada en hasta el 100% de cereales no malteados. El proceso debería ser fácilmente adaptable a los sistemas de elaboración de cerveza usados en la elaboración de cerveza basados en materia prima malteada. Así el macerado debería ser filtrable y además otros parámetros como la composición de aminoácidos y cantidad de azúcares fermentables deberían ser comparables al macerado basado en los cereales malteados correspondientes incluso si el(los) cereal(es) es/son 100% cereal(es) no malteados. Finalmente, el tiempo de maceración debería ser comparable a aquel de la maceración de materia prima malteada mientras todavía mantiene las características buenas por ejemplo el perfil de azúcar del macerado y el producto de cerveza.

30 [0014] Por lo tanto, es un objeto de la invención desarrollar un proceso para producir un mosto de una molienda que comprende al menos 70%, e incluso hasta 100%, de cereales no malteados.

35 RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que por adición de una combinación adecuada de enzimas exógenas a la trituración, y por activación/inactivación térmica de enzimas endógenas, es ahora posible obtener un mosto basado en hasta el 100% de cereales no malteados, tales como cebada.

[0016] Un proceso para la producción de un mosto de cerveza, comprendiendo:
a. obtener un macerado por maceración de una molienda, de la cual al menos 70% en peso es(son) cereal(es) no malteado(s) que comprende(n) actividad de β -amilasa y de la cual menos del 30% en peso es(son) cereal(es) malteado(s), a una temperatura en la que enzimas (añadidas) exógenas y la β -amilasa endógena son activas;
45 b. contactar la trituración con enzimas exógenas comprendiendo:
i. una α -amilasa,
ii. una pululanasa,
iii. una proteasa,
50 iv. una β -glucanasa,
v. una lipasa, y
vi. una xilanasa;
c. fin de maceración y filtración del macerado para obtener el mosto.

55 [0017] En una forma de realización preferida, el(los) cereal(es) no malteado(s) son de la tribu *Triticeae*, por ejemplo cebada, espelta, trigo, centeno. En otra forma de realización el(los) cereal(es) no malteado(s) son cualquier cereal no malteado, tal como pero no limitado a cebada, espelta, trigo, centeno, maíz, avena o arroz o cualquier mezcla de los mismos. Así en otra forma de realización de la invención la molienda comprende una mezcla de cereales no malteados, tal como pero no limitado a una mezcla de cebada no malteada y trigo no malteado, una mezcla de arroz no malteado y cebada no malteada.

[0018] En una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento, donde la molienda comprende además otras fuentes de carbohidrato, tales como jarabes de elaboración de cerveza o cualquier mezcla de los mismos.

65 [0019] En otra forma de realización, las enzimas exógenas del paso b. anterior además comprenden una fitasa.

[0020] En una forma de realización preferida, la temperatura de la maceración está en un rango que optimiza la actividad de β -amilasa y reduce la actividad de lipoxigenasa.

[0021] Una forma de realización preferida de la invención concierne a un proceso donde la pululanasa es termoestable con una actividad enzimática relativa por encima del 60% sobre un periodo de 30 min, a 65 °C y a nivel de pH 5.

[0022] También se describe un mosto producido por el proceso de la invención. Además, la invención se refiere al uso del mosto para la producción de cervezas de cualquier tipo, por ejemplo tipos de cerveza lager clara y oscura, tipos de cerveza ale clara y oscura, cervezas de trigo, todas las porter, stout, hielo concentrado (por ejemplo. eisbock), tipos de vino de cebada o cerveza happoushu.

[0023] El mosto producido comprende uno o varios aminoácidos seleccionados de
a. prolina a una concentración a menos de 2 mM, preferiblemente menos de 1 mM, y de la forma más preferible menos de 0.5 mM en el mosto;
b. serina a una concentración por encima de 0.1 mM, preferiblemente por encima de 0.125 mM, y de la forma más preferible por encima de 0.15 mM; y
c. metionina a una concentración por encima de 0.05 mM, preferiblemente por encima de 0.08 mM, y de la forma más preferible por encima de 0.10 mM.

[0024] También se describe una mezcla enzimática que comprende;

- i. una actividad de α -amilasa,
- ii. una actividad de pululanasa, donde la pululanasa es termoestable
- iii. una actividad proteolítica, y

iv. una actividad de β -glucanasa;
una mezcla enzimática que comprende;

- i. una actividad de α -amilasa,
- ii. una actividad de pululanasa,
- iii. una actividad proteolítica,
- iv. una actividad de β -glucanasa; y
- v. una actividad de xilanas.

[0025] La mezcla enzimática comprende además actividad de lipasa.

FIGURAS

[0026]

La Figura 1 muestra la turbidez (NTU) de un mosto producido a partir de la cantidad en aumento de cebada cuando solo Ultraflo Max es exógenamente añadido.

La Figura 2 muestra la fermentabilidad de un mosto producido a partir del 100 % de cebada no malteada o 100 % de cebada malteada.

DEFINICIONES

[0027] En toda esta divulgación, se usan varios términos generalmente entendidos por personas expertas en la técnica. Diferentes términos se usan con significados específicos, no obstante, y son entendidos tal y como se define por lo siguiente.

[0028] El término "malteado" es un proceso por el cual los granos son hechos germinar y son luego secados.

[0029] El término "grano malteado" se entiende como cualquier grano de cereal, en particular cebada, que ha sido sometido a un proceso de malteado.

[0030] El término "grano no malteado" se entiende como cualquier grano de cereal, en particular cebada, que no ha sido sometido a un proceso de malteado. Los términos sin maltear y no malteado podrían ser usados de forma intercambiable en el presente contexto.

[0031] El término "molienda" se entiende como el material que contiene almidón o que contiene azúcar que es la base para la producción de cerveza. Puede incluir cereal malteado y no malteado al igual que adjunto.

[0032] El término "cereales" se entiende como granos que son cualquier material que contiene almidón usado como materia prima por ejemplo para la producción de cerveza tal como, pero no limitado a, cebada, trigo, sorgo, maíz, arroz, avena y centeno. Los cereales pueden ser malteados o no malteados.

[0033] El término "adjuntos" es normalmente entendido como materia prima que se puede añadir al ingrediente principal de la molienda, que generalmente son cereales malteados. Por tanto debido a que los granos no malteados

normalmente solo comprenden una pequeña parte de la molienda, los cereales no malteados son típicamente definidos como un adjunto junto con carbohidratos líquidos tales como azúcares y almíbares. Los adjuntos podrían ser bien sólidos o líquidos o ambos, donde la parte sólida puede ser cereales no malteados, tales como cebada, maíz y arroz mientras que la parte líquida puede ser carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcar y jarabes.

5

[0034] En este contexto no obstante, lo que se puede considerar como adjunto puede ser el ingrediente principal. Así los cereales no malteados que en un contexto tradicional son un adjunto pueden según la presente invención comprender 100 % de la materia prima.

10

[0035] Por consiguiente, cereales no malteados están normalmente comprendidos en el término adjunto no obstante debido a que los cereales no malteados preferiblemente comprenden más del 70 % de la materia prima y los cereales malteados preferiblemente son inferiores al 30 % de la materia prima los términos son en estos contextos más fácilmente entendidos puesto que:

15

[0036] La molienda puede comprender cereales malteados y no malteados y adjuntos. En este contexto los adjuntos se entienden como la parte de la molienda que no está malteada o cereal no malteado. Así los adjuntos según la presente invención son preferiblemente la parte líquida tal como jarabes de elaboración de cerveza y azúcares.

20

[0037] Cereales no malteados son cualquier cereal no malteado, así cualquier grano que contiene almidón tal como, pero no limitado a, cebada, maíz, arroz, centeno, avena, sorgo y trigo. Por consiguiente molienda a partir del 100 % de granos no malteados puede comprender cebada no malteada y otros cereales sin cebada no malteados tal como arroz y trigo.

25

[0038] En otra forma de realización de la invención la molienda comprende una mezcla de cereales no malteados, tal como pero no limitado a una mezcla de cebada no malteada y trigo no malteado, una mezcla de arroz no malteado y cebada no malteada. Así la molienda puede comprender 50 % de cebada no malteada y 50 % de otros cereales no malteados, tal como trigo y arroz.

30

[0039] En una forma de realización especialmente preferida de la invención el(los) cereal(es) no malteado(s) comprende(n) más del 70% de la molienda y los cereales malteados comprenden menos del 30% de la molienda.

[0040] El término "macerado" se entiende como un lodo que contiene almidón que comprende malta de cebada molida, otro material que contiene almidón, o una combinación de los mismos, sumergidos en agua para hacer mosto.

35

[0041] El término "proceso de maceración" o perfil de maceración o simplemente maceración se entiende como el proceso de combinar granos con agua y calentar la mezcla con reposos a ciertas temperaturas para permitir que las enzimas en la trituration descompongan el almidón del grano en azúcares, para crear un mosto.

40

[0042] Fin de la maceración o "mashing out" es cuando la temperatura del macerado es aumentada. Esto libera aproximadamente un 2% más de almidón, y hace el macerado menos viscoso.

[0043] El término "mosto" se entiende como el licor no fermentado resultante después de la extracción de la molienda durante la maceración. Los términos mosto de cerveza y mosto se usan de forma intercambiable por toda la aplicación.

45

[0044] El término "granos residuales" se entiende como los sólidos drenados restantes cuando la molienda ha sido extraída y el mosto separado.

[0045] El término "cerveza" es aquí entendido como un mosto fermentado.

50

[0046] El término "producto de cerveza" es aquí entendido como comprendiendo, "macerado", "mosto", "granos residuales" y "cerveza".

[0047] El término "DP1" significa glucosa.

55

[0048] El término "DP2" significa maltosa.

[0049] El término "DP3" significa maltotriosa.

60

[0050] Los términos "DP4+" o "DP4/4+" significan dextrina, o maltooligosacáridos de un grado de polimerización de 4 o superior.

[0051] El término "Fru" significa fructosa.

[0052] El término "RDF" significa grado real de fermentación.

65

[0053] El término "FAN" significa amino nitrógeno libre.

[0054] El término "Plato" (°P) significa gramos de extracto por 100 g de mosto (gramo de extracto/100 g mosto).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0055] Por la adición de una combinación de enzimas exógenas, por ejemplo α -amilasa, isoamilasa/pululanasa, actividad generadora de FAN (proteasas) y actividades promotoras de la filtrabilidad (beta-glucanasa y/o xilanasa), al macerado y por la activación térmica simultánea de la β -amilasa endógena generadora de maltosa, es posible obtener un mosto basado en hasta incluso el 100% de cereal(es) no malteado(s).

[0056] Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un mosto de cerveza, comprendiendo:

a. obtener un macerado por maceración de una molienda, de la cual al menos el 70% en peso es(son) cereal(es) no malteado(s) que comprende(n) actividad β -amilasa y de la cual menos del 30% en peso es(son) cereal(es) malteado(s), a una temperatura en la que enzimas (añadidas) exógena(s) y la β -amilasa endógena son activas;

b. contactar el macerado con enzimas exógenas comprendiendo:

i. una α -amilasa,

ii. unas pululanasa,

iii. una proteasa,

iv. una β -glucanasa,

v. una lipasa, y

vi. una xilanasa;

c. fin de la maceración y filtración del macerado para obtener el mosto.

[0057] En un aspecto preferido, la invención se refiere a un procedimiento, donde la molienda comprende al menos 70% en peso de cereal(es) no malteado(s), tal como al menos 75% en peso, de forma más preferible al menos 80% en peso, de forma más preferible al menos 85% en peso, de forma más preferible al menos 86% en peso, de forma más preferible al menos 87% en peso, de forma más preferible al menos 88% en peso, de forma más preferible al menos 89% en peso, de forma más preferible al menos 90% en peso, de forma más preferible al menos 91% en peso, de forma más preferible al menos 92% en peso, de forma más preferible al menos 93% en peso, de forma más preferible al menos 94% en peso, de forma más preferible al menos 95% en peso, de forma más preferible al menos 96% en peso, de forma más preferible al menos 97% en peso, de forma más preferible al menos 98% en peso, incluso de forma más preferible 99% en peso, y de la forma más preferible 100% en peso de cereal(es) no malteado(s).

[0058] Debe entenderse que al menos 70 % en peso de cereal(es) no malteado(s) puede ser uno o varios cereal(es) donde al menos uno del(los) cereal(es) contiene actividad β -amilasa.

[0059] En un aspecto de la invención la molienda comprende menos del 30% en peso de cereales malteados, de forma más preferible menos del 25% en peso, de forma más preferible menos del 20% en peso, de forma más preferible menos del 15% en peso, de forma más preferible menos del 10% en peso, de forma más preferible menos del 5% en peso e incluso de forma más preferible menos del 3% en peso, y de la forma más preferible la molienda comprende 0 % en peso de cereales malteados.

[0060] En una forma de realización preferida, el(los) cereal(es) no malteado(s) es(son) del grupo *Triticeae*. Preferido dentro de este grupo son cebada, espelta, trigo y centeno. *Triticeae* es un grupo dentro de la subfamilia de hierbas *Pooideae* que incluye géneros con muchas especies domesticadas, EA Kellogg, R Appels, RJ Mason- Gamer - SYSTEMATIC BOTANY, 1996. Los mayores géneros de cultivo son descubiertas en esta tribu incluyendo trigo, cebada, y centeno. En otra forma de realización preferida la molienda comprende cereales no malteados diferentes de la tribu *Triticeae*, tal como pero no limitado a arroz, maíz, avena, sorgo.

[0061] En otra forma de realización preferida el(los) cereal(es) no malteado(s) es(son) seleccionado(s) del grupo que comprende cebada, espelta, trigo, centeno, maíz, avena o arroz o cualquier mezcla de los mismos.

[0062] Así en una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento, donde la molienda comprende además uno o varios cereal(es) no malteado(s) adicional(es) tal como molienda de maíz, almidón de maíz y arroz. La molienda puede por lo tanto comprender una mezcla de cereales no malteados, tal como pero no limitado a una mezcla de cebada no malteada y trigo no malteado o una mezcla de arroz no malteado y cebada no malteada.

[0063] En una forma de realización preferida particular de la invención el cereal no malteado es cebada.

[0064] En otro aspecto la molienda comprende además 0-50 % en peso de otras fuentes de carbohidrato, tales como jarabes de elaboración de cerveza o cualquier mezcla de los mismos.

[0065] La xilanasa exógena del paso b. anterior es preferiblemente familia GH10 (glicosil hidrolasa de familia 10) que puede mejorar la filtración de mosto y cerveza.

[0066] La lipasa exógena del paso b. anterior puede mejorar la filtración de mosto y reducir la opacidad.

[0067] En otra forma de realización las enzimas exógenas del paso b. anterior además comprenden una actividad de fitasa.

[0068] La temperatura de maceración, es decir la temperatura en la que las enzimas exógenas (añadidas) y la β -amilasa endógena son activas, está en un rango que optimiza la actividad de cada enzima diferente, en cada paso de calentamiento. El proceso de maceración es preferiblemente realizado en tres pasos cada uno optimizado para las enzimas diferentes. Estos pasos se pueden referir como restos enzimáticos o pasos enzimáticos.

[0069] Así un aspecto especial concierne el perfil de temperatura de un proceso de maceración para producir un mosto de cerveza, donde

Un primer paso se realiza entre 50 y 58 °C,
Un segundo paso se realiza entre 60 y 65 °C, y
Un tercer paso se realiza entre 70 y 80 °C.

[0070] Las diferentes enzimas en el proceso de maceración tanto exógenas como endógenas tienen diferente temperatura óptima y el proceso de maceración puede ser ejecutado a temperaturas diferentes durante un periodo de tiempo determinado para dejar reaccionar a las enzimas. Estos periodos son frecuentemente referidos como restos de enzima.

[0071] En el primer paso, que se puede denominar el paso proteolítico, la temperatura está preferiblemente en la gama de optimizar por ejemplo la enzima proteolítica, la temperatura está preferiblemente entre 45°C y 58°C, tal como preferiblemente entre 46°C y 57°C, tal como preferiblemente entre 47°C y 56°C, tal como preferiblemente entre 48°C y 55°C, tal como preferiblemente entre 49°C y 54°C, tal como preferiblemente entre 50°C y 54°C, tal como preferiblemente entre 51°C y 54°C, tal como preferiblemente entre 52°C y 54°C, de la forma más preferible entre 53°C y 54°C, tal como 54°C.,

[0072] En el segundo paso la temperatura está preferiblemente en la gama de optimizar por ejemplo las enzimas de conversión de almidón, tal como la β -amilasa y pululanasa. Este paso es frecuentemente referido como el paso de sacarificación y la temperatura está preferiblemente entre 60°C y 72°C, tal como preferiblemente entre 60°C y 70°C, tal como preferiblemente entre 62°C y 68°C, tal como preferiblemente entre 63°C y 67°C, tal como preferiblemente entre 64°C y 66°C, y de la forma más preferible entre 64°C y 65 °C, tal como 64°C.

[0073] En el tercer paso, que también se puede referir como fin de la maceración o "mashing out", se libera aproximadamente 2% más almidón, y hace el macerado menos viscoso, permitiendo que la filtración se procese más rápido. La temperatura de mashing out es preferiblemente entre 72°C y 82°C, tal como preferiblemente entre 73°C y 81°C, tal como preferiblemente entre 74°C y 80°C, tal como preferiblemente entre 75°C y 79°C, tal como preferiblemente entre 76°C y 78°C, de la forma más preferible la temperatura es entre 78°C-80 °C, tal como 80 °C.

[0074] Lipoxigenasa endógena se conoce por ser una fuente de sabor extraño, y en un aspecto preferido la temperatura de maceración, en el primer paso de maceración al que se hace referencia arriba está en un rango que reduce la actividad de lipoxigenasa al menos 50%, preferiblemente 55%, preferiblemente 60%, preferiblemente 65%, preferiblemente 70%, preferiblemente 75%, preferiblemente 80%, preferiblemente 85% de la forma más preferible 90% con respecto a la actividad en la maceración a 54°C.

[0075] También se describe una mezcla enzimática comprendiendo:

- i. una actividad de α -amilasa,
- ii. una actividad de pululanasa, donde la pululanasa es termoestable
- iii. una actividad de proteolítica, y
- iv. una actividad de β -glucanasa;
- o una mezcla enzimática que comprende;
- v. una actividad de α -amilasa,
- vi. una actividad de pululanasa,
- vii. una actividad proteolítica,
- viii. una actividad de β -glucanasa; y
- ix. una actividad de xilanas.

[0076] Las mezclas enzimáticas pueden comprender además actividad de lipasa.

[0077] Los términos mezcla enzimática y combinación enzimática se usan de forma intercambiable en toda la solicitud. Los términos se deben entender como una mezcla o combinación de diferentes enzimas o actividades enzimáticas. Las enzimas en la mezcla o combinación se pueden adicionar en cualquier orden o juntas. Las enzimas si no se adicionan juntas podrían ser añadidas en cualquier orden y no es necesariamente añadida en el orden enumerado arriba.

[0078] Las enzimas podrían ser añadidas en cualquier momento de la maceración o antes de la maceración. Así las enzimas se pueden adicionar a los ingredientes de macerado, por ejemplo, el agua y/o la molienda antes, durante o después de la formación del macerado. Las enzimas se pueden adicionar juntas o separadamente.

[0079] En un aspecto preferido, la actividad de α -amilasa está provista por una α -amilasa de origen fúngico, por ejemplo de *Aspergillus niger*, u origen bacteriano, por ejemplo *Bacillus*. Así la α -amilasa puede ser una variante de α -amilasa bacteriana con termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o baja concentración de Ca^{2+} . Preferiblemente, la actividad de α -amilasa en el macerado es 0,1-1,0 KNU(S)/g, de forma más preferible 0,2-0,4 KNU(S)/g, y de la forma más preferible 0,25-0,35 KNU(S)/g en peso de cereal(es) en seco. Preferiblemente la α -amilasa tiene al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, de forma más preferible al menos 90%, preferiblemente al menos 91%, preferiblemente al menos 92%, preferiblemente al menos 93%, preferiblemente al menos 94%, de forma más preferible al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, de forma más preferible al menos 98%, y de la forma más preferible al menos 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:1 (una variante de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* con las mutaciones I181* G182* N193F, descritas en WO99/19467 y disponibles como Termamyl® SC de Novozymes A/S).

[0080] En una forma de realización preferida de la invención, la actividad desramificante de almidón está provista por una pululanasa. Está además descrito que la actividad desramificante está provista por otras enzimas desramificantes tales como pero no limitado a una isoamilasa o dextrinasa límite. En una forma de realización de la invención la actividad desramificante está provista por una mezcla de enzimas desramificantes tal como pero no limitado a una pululanasa y una isoamilasa.

[0081] Así en una forma de realización preferida de la invención, una actividad enzimática de pululanasa (E.C. 3.2.1.41) es exógenamente suministrada y está presente en el macerado. La pululanasa se puede adicionar a los ingredientes de macerado, por ejemplo, el agua y/o la molienda antes, durante o después de la formación del macerado.

[0082] Las pululanosas según la presente invención es preferiblemente pululanasa de p. ej. *Pyrococcus* o *Bacillus*, tal como *Bacillus acidopulluliticus* por ejemplo aquel descrito en FEMS Microbiol. Letters 115: 97-106, o pululanasa está disponible de Novozymes como Promozyme 400L y con la secuencia mostrada en SEC ID n°: 2. La pululanasa también puede ser de *Bacillus naganensis*, o *Bacillus deramificans* por ejemplo tal como derivada de *Bacillus deramificans* (patente US 5,736,375) y con la secuencia mostrada en SEC ID n°: 7. La pululanasa también puede ser una pululanasa diseñada a partir de, por ejemplo una cepa de *Bacillus*.

[0083] Otras pululanosas se pueden derivar de *Pyrococcus woesei* descritas en PCT/DK91/00219, o la pululanasa se puede derivar de *Fervidobacterium* sp. Ven 5 descrita en PCT/DK92/00079, o la pululanasa se puede derivar de *Thermococcus celer* descrita en PCT/DK95/00097, o la pululanasa se puede derivar de *Pyrodictium abisseyi* descrita en PCT/DK95/00211, o la pululanasa se puede derivar de *Fervidobacterium pennavorans* descrita en PCT/DK95/00095, o la pululanasa se puede derivar de *Desulfurococcus mucosus* descrita en PCT/DK95/00098.

[0084] De la forma más preferible la pululanasa es derivada de *Bacillus acidopulluliticus*. Una enzima de pululanasa preferida para ser usada en los procesos y/o composiciones de la invención es una pululanasa con una secuencia de aminoácidos que es al menos 50%, tal como al menos 55%, tal como al menos 60%, tal como al menos 65%, tal como al menos 66%, tal como al menos 70%, tal como al menos 75%, tal como al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 86%, tal como al menos 87%, tal como al menos 88%, tal como al menos 89%, tal como al menos 90%, tal como al menos 91%, tal como al menos 92%, tal como al menos 93%, tal como al menos 94%, tal como al menos 95%, tal como al menos 96%, tal como al menos 97%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% o incluso 100% idéntica a la secuencia mostrada en la SEC ID NO:8 (NS26062, PulC, de *Bacillus acidopulluliticus*); en particular cuando se alinean utilizando el programa Needle usando Matrix: BLO-SUM62; penalización de iniciación de gap: 10.0; penalización por extensión de gap: 0.5; matriz de identidad sin gap. Los términos Pul C, NS26062 y pululanasa C se usan de forma intercambiable en toda la aplicación.

[0085] La pululanasa se adiciona en dosificación de 0,1 a 3 PUN/g SS, tal como 0,2 a 2,9, tal como 0,3 a 2,8, tal como 0,3 o 2,7 tal como 0,3 o 2,6 tal como 0,3 a 2,5 tal como 0,3 a 2,4, tal como 0,3 a 2,3, tal como 0,3 a 2,2, tal como 0,3 a 2,1, tal como 0,3 a 2,0, tal como 0,3 a 1,9, tal como 0,3 a 1,8, tal como 0,3 a 1,7, tal como 0,3 a 1,6, de la forma más preferible pululanasa se adiciona en dosificación tal como 0,3 a 1,5, preferiblemente 0,4 a 1,4, de forma más preferible 0,5 a 1,3, de forma más preferible 0,6 a 1,2, de forma más preferible 0,7 a 1,1, de forma más preferible 0,8 a 1,0, de forma más preferible 0,9 a 1,0. En una forma de realización particular de la invención la enzima se añade en 0,3 PUN/g de SS, tal como 0,4 PUN/g de SS, tal como 0,5 PUN/g de SS en una forma de realización particularmente preferida de la invención la dosis de enzimas no es mayor que 1 PUN/g de SS. Preferiblemente la isoamilasa y/o actividad de pululanasa en el macerado es 0,1-2,0 PUN/g, de forma más preferible 0,5-1,0 PUN/g en peso de cereal(es) en seco.

[0086] La actividad relativa de las enzimas desramificantes, tales como pululanosas, puede variar considerablemente a temperaturas diferentes por ejemplo como se demuestra en el ejemplo 2 de la aplicación. Las enzimas desramificantes

están trabajando con las otras enzimas en el macerado, en particular la β -amilasa, que es normalmente endógena y la α -amilasa que puede ser añadida endógena o exógenamente. Así una enzima desramificante preferida según la invención es una enzima con alta actividad enzimática relativa en el rango de temperatura en el que la -amilasa y la -amilasa es activa.

La α -amilasa es normalmente activa a una temperatura más alta que la β -amilasa y el paso de sacarificación del proceso de maceración, el paso donde el almidón se convierte en azúcares fermentables por α -amilasa, β -amilasa y una enzima desramificante, es preferiblemente ejecutado a una alta temperatura, tal como al menos 63 °C. Así la enzima desramificante según la invención es preferiblemente termoestable y termoactiva. Los términos termoestable y termoactiva se usan de forma intercambiable por toda la aplicación.

[0087] En este contexto una enzima termoestable es una enzima con una actividad enzimática relativa por encima del 60% medido en un periodo de 30 min, a 65 °C y a nivel de pH 5.

[0088] La actividad relativa, que en este contexto es la actividad enzimática relativa, se calcula por ajuste de la actividad máxima al 100% (máximo) y ajustando las actividades a otras temperaturas relativas a la temperatura máxima.

[0089] Así preferiblemente la enzima desramificante es una pululanasa e incluso de forma más preferible la actividad de pululanasa está provista por una pululanasa que es termoestable con una actividad enzimática relativa por encima del 60% sobre un periodo de 30 min, a 65 °C y a nivel de pH 5. Un ejemplo de una pululanasa termoestable se da en el ejemplo 2.

[0090] En una forma de realización actividad enzimática relativa de la pululanasa está por encima de 60%, tal como por encima de 61%, tal como por encima de 62%, tal como por encima de 63%, tal como por encima de 64%, tal como por encima de 65%, tal como por encima de 66%, tal como por encima de 67%, tal como por encima de 68%, tal como por encima de 69%, tal como por encima de 70%, tal como por encima de 71%, tal como por encima de 72%, tal como por encima de 73%, tal como por encima de 74%, tal como por encima de 75%, tal como por encima de 76%, tal como por encima de 77%, tal como por encima de 78%, tal como por encima de 79%, tal como por encima de 80%, tal como por encima de 81%, tal como por encima de 82%, tal como por encima de 83%, tal como por encima de 84%, tal como por encima de 85%, tal como por encima de 86%, tal como por encima de 87%, tal como por encima de 88%, tal como por encima de 89%, tal como por encima de 90%, tal como por encima de 91%, tal como por encima de 92%, tal como por encima de 93%, tal como por encima de 94%, tal como por encima de 95%, tal como por encima de 96%, tal como por encima de 97%, tal como por encima de 98%, tal como por encima de 99% e incluso 100% a 65°C, cuando se mide en un periodo de 30 minutos, a pH 5,0.

[0091] En una forma de realización preferida particular de la invención una pululanasa termoestable tiene una actividad enzimática relativa por encima del 80% en un periodo de 30 min, a 65 °C y a nivel de pH 5.

[0092] En una forma de realización determinada la pululanasa tiene por encima del 80%, tal como por encima del 85%, tal como por encima del 90% tal como por encima del 95%, o incluso el 100% de actividad enzimática restante en un periodo de 30 min bajo condiciones de maceración con 12 °P de cebada, a temperatura de gelatinización de cebada no malteada, y a pH en el rango de 5,6-6,2, en comparación con la actividad antes de la incubación a la temperatura de gelatinización de cebada no malteada.

[0093] En otra forma de realización la actividad de proteasa está provista por un sistema de enzimas proteolíticas con una actividad de generación de FAN adecuada incluyendo endoproteasas, exopeptidasas o cualquier combinación de estas, preferiblemente una metaloproteasa. Preferiblemente la actividad de proteasa en el macerado es 0,0005-0,002 AU/g, de forma más preferible 0,001-0,0015 AU/g en peso de cereal(es) en seco. Preferiblemente, la proteasa tiene al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94%, de forma más preferible al menos 95% de forma más preferible al menos 96%, de forma más preferible al menos 97% de forma más preferible al menos 98%, y de la forma más preferible al menos 99% o incluso 100 % de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:3 (una metaloproteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, descrita en WO9967370, disponible como Neutrase® de Novozymes A/S).

[0094] En otra forma de realización, la actividad -glucanasa (E.C.3.2.1.4.) se añade al macerado. Preferiblemente la actividad de β -glucanasa en el macerado es 0,1-1,5 FBG/g, tal como 0,2-1,2 FBG/g, tal como 0,4-1,0 FBG/g, tal como 0,5-1,0 FBG/g en peso de cereal(es) en seco. β -glucanasa también es denominada celulasa y puede ser de origen fúngico o bacteriano. Tal como de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o de *Bacillus* tal como *B subtilis*. La actividad β -glucanasa añadida también puede originarse de malta. En una forma de realización preferida particular de la invención la β -glucanasa se añade junto con xilanasa en una mezcla enzimática denominada Ultraflo Max. Ultraflo Max es una mezcla enzimática de xilanasa y β -glucanasa, la mezcla es descrita en la aplicación WO2005/059084 A1.

[0095] En otra forma de realización, la actividad de xilanasa está provista por una xilanasa de glicosil hidrolasa de familia 10.

- Preferiblemente la actividad de xilanasa en el macerado es 0.02-0.1 FXU, de forma más preferible 0,04-0,08 FXU-S/g en peso de cereal(es) en seco. Preferiblemente, la xilanasa tiene al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94% de forma más preferible al menos 95%, de forma más preferible al menos 96%, de forma más preferible al menos 97% de forma más preferible al menos 98%, y de la forma más preferible al menos 99% o incluso 100% de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:4 (descrita en WO 94/21785, disponible como Shearzyme® de Novozymes A/S).
- [0096] En otra forma de realización, la actividad de lipasa está provista por una lipasa con actividad para triglicéridos y/o galactolípido y/o fosfolípido. Preferiblemente, la actividad de lipasa está provista por una lipasa de *Fusarium* (incluyendo *F. oxysporum* y *F. heterosporum*), *Aspergillus* (incluyendo *A. tubigensis*), *Rhizopus* (incluyendo *R. oryzae*) o *Thermomyces* (incluyendo *T. lanuginosus*) o una variante de estas. Un ejemplo es Lipopan X (Lipopan Xtra), una variante de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* con las sustituciones G91A +D96W +E99K +P256V +G263Q +L264A +I265T +G266D +T267A +L269N +270A +271 G +272G +273F (+274S), descrito en WO2004099400A2. Preferiblemente, la lipasa tiene al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94%, de forma más preferible al menos 95%, de forma más preferible al menos 96%, de forma más preferible al menos 97% de forma más preferible al menos 98%, y de la forma más preferible al menos 99% o incluso 100 % de identidad a residuos 1-316 o 1-273 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:5 (lipasa/fosfolipasa de *Fusarium oxysporum*, descritos en EP 869167, disponibles de Novozymes A/S como Lipopan® F). Preferiblemente, la actividad de lipasa en el macerado es 0-50 LU/g, tal como 0-40 LU/g, tal como 0-30 LU/g, tal como 0-20 LU/g en peso de cereal(es) en seco. En una forma de realización especialmente preferida de la invención la lipasa es Lipozyme TL o lipolasa, esta lipasa tiene un efecto significativamente bueno en la velocidad de filtración y reducción de neblina. Así en una forma de realización preferida especial de la invención la lipasa tiene al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94%, de forma más preferible al menos 95%, de forma más preferible al menos 96%, de forma más preferible al menos 97% de forma más preferible al menos 98%, y de la forma más preferible al menos 99% o incluso 100 % de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 9. La lipasa también puede ser Lipex, una variante de Lipozyme teniendo al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 95%, de forma más preferible al menos 98%, y de la forma más preferible al menos 99% o incluso 100 % de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº: 10. Las lipasas degradan el lípido de cebada por ejemplo los triglicéridos en glicéridos parciales y ácidos grasos libres. Esto lleva a una turbidez inferior y muy mejorada filtración de macerado y propiedades de filtración.
- [0097] En otra forma de realización, la actividad de fitasa está provista por una fitasa de *Aspergillus niger*, *Peniophora* o *Citrobacter*. Preferiblemente, la actividad de fitasa en el macerado es 0-5 FYT / g, de forma más preferible 0.5-1.5 FYT/g en peso de cereal(es) en seco. Preferiblemente, la fitasa tiene al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94%, de forma más preferible al menos 95%, de forma más preferible al menos 96%, de forma más preferible al menos 97%, de forma más preferible al menos 98%, y de la forma más preferible al menos 99% o incluso 100 % de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:6 (una variante de fitasa de *Peniophora lycii*, descrita en WO 2003/066847).
- [0098] En alguna forma de realización de la invención se añade *Flavourzyme*. *Flavourzyme* es una composición enzimática obtenida de la cepa NN000562 de *A. oryzae* originalmente obtenida como ATCC 20386. FLAVOURZYME contiene actividades de proteasa ácida y alcalina.
- [0099] También se describe un mosto producido por el proceso de la invención, y el uso del mosto para la producción de cervezas de cualquier tipo, por ejemplo tipos de cerveza lager clara y oscura, tipos de cerveza ale clara y oscura, cervezas de trigo, todas las porter, stout, hielo concentrado (por ejemplo eisbock), tipos de vino de cebada o cerveza happoushu.
- [0100] Los componentes que contienen nitrógeno son importantes componentes del mosto porque ellos afectan el carácter de la cerveza, tal como el sabor y modelo de fermentación. Los compuestos que contienen nitrógeno son importantes nutrientes para la levadura con la excepción de prolina que es difícilmente asimilada por la levadura por tanto es favorable tener una pequeña cantidad de prolina o ninguna prolina en el mosto. El mosto comprende uno o varios aminoácidos seleccionados de
- prolina a una concentración menor que 2 mM, preferiblemente menor que 1 mM, y de la forma más preferible menor que 0,5 mM en el mosto;
 - serina a una concentración por encima de 0,1 mM, preferiblemente por encima de 0,125 mM, y de la forma más preferible por encima de 0-15 mM; y

c. metionina a una concentración por encima de 0,05 mM, preferiblemente por encima de 0,08 mM, y de la forma más preferible por encima de 0,10 mM.

5 [0101] Así en un aspecto la concentración de prolina está por debajo de 2 mM, tal como por debajo de 1,5 mM, tal como por debajo de 1 mM, tal como por debajo de 0,5 mM, tal como por debajo de 0,25 mM.

[0102] En otro aspecto la concentración de serina está por encima de 0,1 mM, tal como 0,125 mM, tal como 0,15 mM, tal como 0,2 mM.

10 [0103] En otro aspecto la concentración de metionina está por encima de 0,005 mM, tal como 0,008 mM, tal como 0,1 mM, tal como 0,125 mM, tal como 0,15 mM.

15 [0104] Los inventores han descubierto sorprendentemente que incluso con cantidades muy altas por ejemplo por encima del 80 % de cereales no malteados tal como cebada no malteada un mosto podría ser producido con una cantidad alta de azúcares fermentables, que en este contexto es DP1-DP3 (glucosa, maltosa y maltotriosa) y en un aspecto preferido particular de la invención la cantidad de maltosa es alta en comparación con la cantidad de glucosa, lo que es favorable porque impide la presión osmótica en la levadura y regula la producción de éster y por lo tanto el perfil de sabor y aroma de la cerveza final.

20 [0105] Así en un aspecto, en el mosto la concentración de maltosa está por encima de 45%, preferiblemente por encima de 50%, preferiblemente por encima de 55%, preferiblemente por encima de 56%, preferiblemente por encima de 57%, preferiblemente por encima de 58%, preferiblemente por encima de 59%, preferiblemente por encima de 60%, preferiblemente por encima de 61%, preferiblemente por encima de 62%, preferiblemente por encima de 63%, preferiblemente por encima de 64%, preferiblemente por encima de 65%, de la forma más preferible la concentración de maltosa es por encima de 70% de la concentración total de carbohidratos.

30 [0106] En otro aspecto, en el mosto la concentración de glucosa está por debajo de 10%, preferiblemente por debajo de 9%, preferiblemente por debajo de 8%, preferiblemente por debajo de 7%, preferiblemente por debajo de 6%, preferiblemente por debajo de 5% de la forma más preferible por debajo de 4%.

35 [0107] Otro aspecto en el mosto: el total de la glucosa, maltosa y concentración de maltotriosa está por encima de 50%, preferiblemente por encima de 55%, preferiblemente por encima de 60%, preferiblemente por encima de 61%, preferiblemente por encima de 62%, preferiblemente por encima de 63%, preferiblemente por encima de 64%, preferiblemente por encima de 65%, preferiblemente por encima de 66%, preferiblemente por encima de 67%, preferiblemente por encima de 68%, preferiblemente por encima de 69%, preferiblemente por encima de 70%, preferiblemente por encima de 71%, preferiblemente por encima de 72%, preferiblemente por encima de 73%, preferiblemente por encima de 74%, preferiblemente por encima de 75%, preferiblemente por encima de 76%, preferiblemente por encima de 77%, preferiblemente por encima de 78%, preferiblemente por encima de 79% y preferiblemente por encima de 80% de la concentración total de carbohidratos.

40 [0108] RDF (grado real de fermentación) se calcula como $RDF\% = 100 \cdot (OE\%P - ER\%) / OE\%P$ mientras que OE significa extracto Original en %P y ER significa extracto real % P medido por un densitómetro (referencia Analytica EBC).

45 [0109] Así en un aspecto el RDF en el mosto es mayor que 60%, tal como al menos 65%, tal como al menos 70%, tal como al menos 75%, tal como al menos 76%, tal como al menos 77%, tal como al menos 78%, tal como al menos 79%, tal como al menos 80%, tal como al menos 81%, tal como al menos 82%, tal como al menos 83%, tal como al menos 84%, tal como al menos 85%, tal como al menos 86%, tal como al menos 87%, tal como al menos 88%, tal como al menos 89%, tal como al menos 90%, tal como al menos 91%, tal como al menos 92%, tal como al menos 93%, tal como al menos 94%, tal como al menos 95%, tal como al menos 96%, tal como al menos 97%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99%, tal como al menos 100%.

55 [0110] Algunas fábricas de cerveza añaden jarabe de cervecería, por ejemplo, jarabe de elaboración de cerveza alto en maltosa a la caldera de mosto que puede aumentar la cantidad de azúcares fermentables. No obstante, aunque jarabe de elaboración de cerveza se puede adicionar según la invención no es necesario aumentar la cantidad de azúcares fermentables o RDF.

60 [0111] También se describe un proceso, donde la proporción de maltosa:glucosa en el mosto es superior a 5:1, tal como superior a 6:1, tal como superior a 7:1, preferiblemente superior a 8:1, preferiblemente superior a 9:1, preferiblemente superior a 10:1, preferiblemente superior a 11:1 en una forma de realización preferida particular la proporción de maltosa:glucosa en el mosto es superior a 12:1.

65 [0112] Durante el proceso de maceración el almidón se degrada en azúcares fermentables y no fermentables y el material proteico se convierte los aminoácidos libres que se usan por la levadura. Según la invención la materia prima usada para maceración puede ser hasta 100 % de cereales no malteados, tal como cebada no malteada sin reducir la fermentabilidad del mosto o reduciendo la cantidad de aminoácidos disponibles para la levadura.

- [0113] Además, la elaboración de cerveza en cereales no malteados puede dar problemas con filtrabilidad debido al exceso de almidón no convertido y β -glucano o xilano, que pueden también causar la opacidad de la cerveza. La adición de enzimas ayudantes de la filtración tal como β -glucanasa puede aumentar la filtrabilidad del mosto. No obstante, cuando el cereal no malteado comprende la parte esencial de la molienda, la β -glucanasa sola no es suficiente para proporcionar mosto filtrable.
- [0114] Los inventores han descubierto sorprendentemente que la adición de enzimas exógenas según la invención, que comprenden actividad α -amilasa, actividad de pululanasa, actividad proteolítica, actividad de lipasa y actividad de β -glucanasa; al macerado preparado de una molienda que comprende al menos 70 % de cereal(es) no malteados produjeron un mosto que es comparable o aún mejor con respecto a por ejemplo FAN, azúcares fermentables (DP1-DP3) y que es filtrable y también tiene una turbidez baja aceptable cuando se compara con un mosto producido de una molienda malteada.
- [0115] El tiempo en cuba de filtración, el tiempo que emplea para filtrar el macerado en la cuba de filtración, si está en un vaso separado, está influido por ejemplo por la turbidez. Así en un aspecto de la invención el mosto es filtrable y tiene una turbidez baja y en una forma de realización de la invención la turbidez está por debajo de 20 NTU (las unidades de turbidez de un nefelómetro calibrado, unidades de turbidez nefelométrica), tal como por debajo de 19 NTU, tal como por debajo de 18 NTU, tal como por debajo de 17 NTU, tal como por debajo de 16 NTU, tal como por debajo de 15 NTU, tal como por debajo de 14 NTU, tal como por debajo de 13 NTU, tal como por debajo de 12 NTU, tal como por debajo de 11 NTU, tal como por debajo de 10 NTU.
- [0116] Una manera de aumentar la cantidad de azúcares fermentables es mediante el aumento del tiempo de maceración por ejemplo mediante el aumento del paso de sacarificación. No obstante, en otro aspecto importante de la invención el tiempo de maceración necesitado para producir un mosto que es altamente fermentable no se aumenta en comparación con el tiempo de maceración para producir un mosto igualmente fermentable basado en la misma cantidad de malta.
- [0117] Esto es sorprendente puesto que generalmente se necesita un tiempo de maceración más largo cuando el macerado se basa en una alta cantidad de cereales no malteados por ejemplo 70% de cebada para dar la misma fermentabilidad y FAN como en un mosto producido en cantidades correspondientes (70%) de malta.
- [0118] El proceso de maceración se completa dentro de 160 minutos, preferiblemente dentro de 120 minutos.
- [0119] El proceso de maceración que comprende todas las enzimas reposa y todos los pasos de calentamiento, se completa dentro de 180 minutos, tal como dentro de 170 minutos, tal como dentro de 160 minutos, tal como dentro de 155 minutos, tal como dentro de 150 minutos, tal como dentro de 145 minutos, tal como dentro de 140 minutos, tal como dentro de 135 minutos, tal como dentro de 130 minutos, tal como dentro de 125 minutos, tal como dentro de 120 minutos, tal como dentro de 115 minutos, tal como dentro de 110 minutos, tal como dentro de 105 minutos, tal como dentro de 100 minutos, tal como dentro de 95 minutos, tal como dentro de 90 minutos, tal como dentro de 85 minutos, tal como dentro de 80 minutos, tal como dentro de 75 minutos, tal como dentro de 70 minutos, tal como dentro de 65 minutos, tal como dentro de 60 minutos.
- [0120] Cuando la malta se sustituye con granos tales como arroz y maíz la molienda puede necesitar ser tratada por decocción o maceración de decocción o decocción de adjuntos, que es un proceso donde una proporción de los granos se hierva separadamente con α -amilasa termoestable y luego son devueltos al macerado. Este proceso es frecuentemente necesitado para estos tipos de granos puesto que la temperatura de gelatinización es superior a la de cebada, malta, y por ejemplo trigo. Así se necesita la pregelatinización para hacer el almidón accesible para todas las enzimas endógenas necesitadas y añadidas. El proceso también se puede usar para dar un sabor malteado a la cerveza.
- [0121] Cereales no malteados, tal como la cebada muestra un comportamiento diferente general en la trituración al de los cereales malteados, como ejemplo, la cebada tiene contenido de agua más alto, no se modifica y es mucho más dura que la malta.
- [0122] Para ejecutar una cuba de filtración con malta y conseguir un rendimiento aceptable (rendimiento y tiempo de filtración) una determinada composición de molienda es necesaria, la composición de molienda se puede medir por una prueba de tamizado.
- [0123] La composición de molienda hecha por molinos de rodillo está principalmente influida por el espacio entre el(los) par(es) de rodillos (dos molinos de rodillos = un par, cuatro molinos de rodillos = dos pares). El primer par tiene siempre un espacio más amplio que el segundo. Para obtener un rendimiento de filtración en comparación con una molienda hecha de malta los inventores han cambiado, este(estos) espacio(s) de rodillos.
- [0124] Los inventores descubrieron que un molino de cuatro rodillos y un molino de seis rodillos (tres pares) podrían

triturar con espacios de rodillos ajustados son bien adecuados para triturar la cebada en la molienda utilizable. Esto es importante puesto que unos buenos rendimientos de filtración solo se pueden conseguir con una composición de molienda optimizada es decir diferente a la composición de molienda óptima de malta.

- 5 [0125] La prueba de tamizado fue realizada según la prueba de tamizado descrita en Anger, H.: MEBAK Band Rohstoffe. 1. Auflage Brautechnische Analysenmethoden. 2006, Freising: Selbstverlag der MEBAK.

Tabla 1

Cebada molida en comparación con malta		
	Cebada	Malta
Criba 1	25%	18%
Criba 2	15%	8%
Criba 3	38%	33%
Criba 4	10%	21%
Criba 5	3%	10%
Fondo	9%	11%

- 10 [0126] Los resultados muestran que para una molienda 100 % exitosa un rendimiento de filtración de la cebada la molienda más gruesa con más foco en la criba 1-3 lleva a un buen rendimiento de filtración. Podría también verse que la molienda de cebada es significativamente diferente de la molienda de malta.

EJEMPLOS:

15

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas

20 Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0127] La actividad amilolítica se puede determinar usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de muestras de mezcla de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, un color azul negruzco es formado, no obstante, durante la descomposición del almidón el color azul se vuelve más débil y gradualmente se convierte en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

25

[0128] Una Unidad Kilo Novo de amilasa alfa (KNU) es igual a 1000 NU. Una KNU se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándares (es decir a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca²⁺; y pH 5,6) convierte 5,26 g de sustancia seca de almidón (Merck Amylum soluble) en dextrinas suficientemente pequeñas para no hacer una reacción de color con yodo.

30

Actividad desramificante (PUN)

[0129] Actividad de pululanasa se puede determinar con respecto a un sustrato de pululano. Pululano es un polímero de D-glucosa lineal que consiste sustancialmente en unidades de maltotriosilo unidas por enlaces 1,6-alfa. Endopululanasa hidroliza los enlaces 1,6- α al azar, liberando maltotriosa, 6³-alfa-maltotriosil maltotriosa, 6³-alfa-(6³-alfa-maltotriosil-maltotriosil)-maltotriosa, etc. El número de enlaces hidrolizados se determina como carbohidrato de reducción que utiliza un método Somogyi-Nelson modificado.

40

[0130] Una unidad pululanasa (PUN) es la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándares (es decir después 30 minutos de tiempo de reacción a 40°C y pH 5,0; y con 0,2% de pululano como sustrato) hidroliza pululano, liberando carbohidrato de reducción con una potencia de reducción equivalente a 1 micromol de glucosa por minuto.

45 Actividad proteolítica (AU)

[0131] La actividad proteolítica se puede determinar usando hemoglobina desnaturalizada como sustrato. En el método Anson-Hemoglobin para la determinación de actividad proteolítica, la hemoglobina desnaturalizada es digerida, y la hemoglobina no asimilada se precipita con ácido tricloroacético (TCA). La cantidad del producto soluble TCA es determinada usando reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y triptófano.

50

[0132] Una unidad de Anson (AU) es definida como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándares (es decir 25°C, pH 7,5 y 10 min. tiempo de reacción) digiere hemoglobina a un nivel inicial de manera que allí se libera una cantidad de producto soluble TCA por minuto que da el mismo color con reactivo de fenol que un miliequivalente de tirosina.

55

Actividad de β -glucanasa (FBG)

[0133] Una unidad beta glucanasa fúngica (FBG) es la cantidad de enzima, que, según las condiciones estándares indicadas más abajo, libera oligosacáridos reducibles o reduce carbohidrato con una capacidad de reducción equivalente a 1 mol de glucosa por minuto.

[0134] Beta glucanasa fúngica reacciona con beta glucano durante el proceso de formación en glucosa o carbohidrato de reducción que se determina como azúcar reductor según el método Somogyi Nelson.

[0135] La muestra debería ser diluida para dar una actividad entre 0,02~0,10 FBG/ml. Las condiciones de reacción estándares son: sustrato: 0,5% de beta glucano de cebada, temperatura: 30°C, pH: 5,0 y el tiempo de reacción 30 min.

[0136] No obstante la actividad celulítica en el producto comercial se mide en unidades de endoglucanasa (EGU), que se puede convertir en FBG. Para celluclast la EGU se puede convertir en FBG multiplicando la EGU por un factor 3.2.

Xilanasa (FXU(S))

[0137] La actividad xilanólítica se puede expresar en unidades FXU(S), determinadas a pH 6,0 con remazol-xilano (4-O-metil-D-glucurono-D-xilan teñido con Remazol Brilliant Blue R, Fluka) como sustrato.

[0138] Una muestra de xilanasa se incuba con el sustrato de remazol-xilano. El fondo de sustrato teñido no degradado se precipita por etanol. El color azul restante en el sobrenadante (como se determina espectrofotométricamente a 585 nm) es proporcional a la actividad de xilanasa, y las unidades de xilanasa son luego determinadas con respecto a una enzima estándar a condiciones de reacción estándares, es decir concentración de sustrato 0,45% p/v, concentración enzimática 0.04 - 0.14 FXU(S)/ml a 50.0 °C, pH 6.0, y en 30 minutos de tiempo de reacción. Actividad de xilanasa en FXU(S) se mide con respecto a una enzima estándar de Novozymes FXU(S) (obtenible de Novozymes), comprendiendo la preparación de xilanasa monocomponente Shearzyme de *Aspergillus aculeatus*.

Lipasa (LU)

[0139] Una unidad de lipasa (LU) es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ácido butírico titulable por minuto a 30.0°C; pH 7,0; con goma arábica como emulsionante y tributirina como sustrato.

Fitasa (FYT)

[0140] Una unidad de fitasa (FYT) es la cantidad de enzima que libera 1 micro-mol de ortofosfato inorgánico por min. bajo las siguientes condiciones: pH 5,5; temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$) a una concentración de 0,0050 mol/l.

Unidad de Leucina Amino Peptidasa (LAPU)

[0141] 1 Unidad de Leucina Amino Peptidasa (LAPU) es la cantidad de enzima, que descompone 1 micro-M de sustrato por minuto a las siguientes condiciones: 26 mM de L-leucina-p-nitroanilida como sustrato, 0,1 M Tris tampón (pH 8,0), 40°C, 10 minutos de tiempo de reacción.

Método de maceración en laboratorio

[0142] A menos que se declare lo contrario, el método de maceración usado en los ejemplos fue realizado de la siguiente manera:

[0143] Primero, la cebada se tritura en molienda fina (Bühler Unirvisale gab 0,2 mm), luego 50 g de cebada molida se añade a una cápsula de maceración y se añaden 200 g de agua precalentada (con cloruro de calcio). La copa se coloca en el baño de maceración (Lochner LB 12 Electronic con 12 copas), el diagrama de maceración se fija (por ejemplo maceración a 50°C o 54°C, mantener temperatura durante 20-30 minutos, aumento de 1°C/minuto hasta 64°C, mantener durante 40-60 minutos, aumento de 1°C/minuto 78 o 80°C, mantener durante 10-20 minutos y reducir la temperatura a 20°C). La solución enzimática se añade al principio a las copas y la maceración es iniciada dando un periodo de maceración total de 140-160 minutos. Después de añadir agua de maceración a un total de 300 g en la copa y de que el macerado es filtrado con un filtro plegado Whatman 597 1/2 (Schleicher & Schuell) para obtener el mosto, después el mosto puede ser analizado.

[0144] Las concentraciones de azúcar/dextrina de mosto (carbohidrato) fueron analizadas en un Sistema de HPLC de Waters (método de Novozymes: 345-SM-2004,01/01) con pre-columna (catión H refill cat. 1250129) dos columnas BoiRad Aminex HPX 87 H calentadas hasta 60°C y flujo de 0,4 ml/minutos con detección RI (detector RI de Waters 2410).

[0145] RDF: Real grado de fermentación, fue determinado por el método descrito en método MEBAK: 2.9.2. Principal: reducción de sustancia seca de mosto, en %, por fermentación en alcohol y CO₂

[0146] NTU: opacidad en el mosto fue analizada por método MEBAK 2.15.1

[0147] En general las dosis enzimáticas son calculadas de la siguiente manera:

Dosificación enzimática en la dosificación meta

[0148]

Enzima	Dosificación meta / g ss	Actividad específica	g de proteína enzimática (EP) / 1000 kg de cebada ss.
Termamyl SC	0,3 KNU(S)/g	43 KNU(S)/mg	6.98 g
Ultraflo Max	300 ppm	4000 EGU/g proteína	52. 5 g
		30 FXU/mg	2.5 g
Pululanasa NS26062	1.0 PUN/g	57 PUN(G)/mg	17.54 g
Neutrasa	0.001 AU/g	60 AU/g	33.3 g
Lipozyme TL	20 LU/g	6100 LU/mg	3.28 g

Ejemplo 1

[0149] El propósito de este ejemplo fue seleccionar la pululanasa más adecuada para la producción de mosto basado en RDF y DP2 (maltosa). Una molienda que comprende 100% de cebada no malteada se preparó como se ha descrito anteriormente.

[0150] A todas las copas se añadió después 50 ppm de Na₂SO₃ y las enzimas:

α-amilasa (Termamyl SC): 0.3 KNU(S)/g,

β-glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max/Viscoflow XL): 300 ppm, proteasa (Neutrasa 0.8) 0,002 AU/g,

Flavourzyme™ 1000 L: 0.1 LAPU/g, y

[0151] Pululanasa como se describe en la tabla 2:

[0152] La maceración fue realizada y a las copas se les añadió agua de ciudad a un total de 300 g después de la maceración. El macerado fue filtrado, y los resultados en la tabla 1 más abajo fueron obtenidos por análisis del mosto:

Tabla 1 100% cebada: RDF, % y azúcar de mosto.

Dosificación enzimática	PUN/g	DP2 % de total	DP4+ % de total	RDF%
-	0.00	48.7	33.2	62.0
Promozyme	0.1	49.4	31.6	64.0
Promozyme	0.2	49.7	30.6	65.0
Promozyme	0.3	50.3*	29.6*	65.8*
Promozyme	0.5	51.6	27.6	67.0
-	0.00	48.7	33.2	62.0
NS26062	0.1	50.0	30.2	64.6
NS26062	0.2	50.8	28.4	66.1
NS26062	0.3	51.3*	27.3*	67.3*
NS26062	0.5	52.4	25.0	69.5

* estimado por regresión lineal

[0153] El RDF está por encima del 60 % con ambas pululanastas, no obstante RDF es más alto cuando se añade NS26062 (PUL C). La cantidad de maltosa (DP2) respecto a la cantidad de dextrinas (DP4) fue también más alta para ambas pululanastas pero de nuevo la cantidad de maltosa con respecto a dextrinas son más altas para NS26062 (PUL C). Así en conclusión: NS26062 (pululanasa C o PULC) mostró el mejor rendimiento, en comparación con Promozyme (Promozyme 400 L) en la actividad de PUN, en la generación de RDF% y maltosa (DP2). En este experimento la ventaja del NS26062 termoestable (pululanasa C o PULC) está claramente demostrada.

Ejemplo 2

[0154] El siguiente ejemplo demuestra la temperatura diferente óptima y la actividad relativa a temperaturas diferentes. La actividad enzimática relativa de tres pululanastas diferentes fue analizada. El método de análisis de la actividad de pululanasa es por detección de la capacidad aumentada de azúcar reductora (reacción Somogyi-Nelson) en las siguientes condiciones:

[0155] Sustrato: 0,2% pululano, pH 5,0, tiempo de reacción 30 minutos, parada de reacción de enzima añadiendo reactivo de cobre Somogyi, seguido de reactivo de color de Nelson y ebullición en 20 minutos. Muestras fueron

incubadas a 30°C, 45°C, 55°C, 60°C, 62,5°C, 65°C y 70°C en 30 minutos. Las muestras fueron analizadas por espectrofotómetro a OD520 nm, y la diferencia entre muestra y blanco (aumentada por la actividad enzimática) fueron usadas en el cálculo de los resultados.

- 5 [0156] La máxima actividad fue establecida al 100% (máximo) y actividades a otras temperaturas se ajustan relativamente al máximo de temperatura.

Tabla 2 Actividad relativa de diferentes pululanases a temperaturas diferentes

Temperatura en minutos	PulC/NS26062 %	Promozyme 400 L %	Promozyme D2/ Optimax 1000 L %
30°C	19,7	20,1	34,4
45°C	47,3	56,8	68,1
55°C	76,8	100,0	100,0
60°C	86,8	87,9	80,0
62,5°C	92,8	76,9	58,4
65°C	100,0	37,2	51,1
70°C	75,6	8,3	11,9

- 10 [0157] Este ejemplo demuestra claramente que PUL C es la más termoestable y termoactiva de las tres pululanases puesto que tiene una significativa actividad relativa más alta por encima de 62,5 °C y puesto que la máxima actividad fue medida pasados 30 minutos a 65°C. La pululanasa PUL C tiene la actividad máxima de las tres pululanases entre 62,5°C y 65°C, que es la temperatura preferida para maceración por tanto la utilización de PUL C como enzima desramificante en un proceso de maceración, es claramente ventajosa.

15 Ejemplo 3

- [0158] El propósito de este experimento fue evaluar la dosificación eficaz de proteína enzimática (EP) por g de ss (gramo de sustancia seca) de 3 de diferentes pululanases (NS26062/PulC, Promozyme 400 L y Promozyme D2 (Optimax 1000 L) en la sacarificación de bien 100% de cebada no malteada o 100% de cebada malteada cuando se aplica en la maceración de infusión durante 2 horas.

- [0159] A todas las copas se les añadió mezcla de enzimas 2 kg /1000 kg cebada:
 α-amilasa (Termamyl SC) 0.3 KNU(S)/g,
 25 β-glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max/Viscoflow XL) 300 ppm,
 Proteasa (Neutrasa) 0.001 AU/g,
 Lipasa (Lipozyme TL 20 LU/g)

- [0160] Dosificaciones de pululanases diferentes fueron añadidas.

- [0161] Actividad específica:

- NS26062: 57 PUN/mg EP.
 Promozyme 400 L: 136 PUN/mg EP
 Promozyme D2:236 NPUN/mg EP
 Isoamilasa de Hayashibara Co Ltd: actividad específica desconocida

- [0162] Las actividades específicas fueron medidas después de que las pululanases fueron purificadas por técnicas cromatográficas estándares

- [0163] Condiciones de maceración: 54°C en 30 minutos, aumento a 64°C en 10 minutos y mantener 45 minutos, aumento a 80°C en 16 minutos y mantener 10 minutos, produciendo mosto con 12,6 Plato.

- 45 **Tabla 3: Efecto de pululanasa en la degradación de dextrina en 100% de maceración de cebada no malteada: que muestra % de carbohidrato no fermentable en el mosto (dextrina/DP4+) con dosificaciones diferentes (g (gramo) EP (proteína enzimática) / 1000 kg cebada no malteada. Algunos experimentos fueron hechos varias veces.**

gEP/1000 kg ss cebada no malteada	NS26062 PULC	Promozyme 400 L	Promozyme D2	Isoamilasa Hayashibara
0(control)	30,5 - 30,8%	30,5 - 30,8%	30,5 - 30,8%	30,5 - 30,8%
8,77	20,1 - 21,4%	-	-	-
	22,3%			
17,5	15,4-18,8%	19,8-20,4%	27,4-27,5%	-
	17,9-18,3%			
26,3	13,6-16,1%	-	-	-

	16,0-16,7%			
35,0	14,9-15,5%	17,1%	-	-
52,5	13,2%			
87,5	-	13,2- 13,7%	21,9-22,4%	-
175	-	11,8- 12,3%	18,7-19,3%	-

5 [0164] Tabla 3 muestra que las tres pululanasa pero no la isoamilasa Hayashibara podrían reducir la cantidad de azúcares no fermentables (dextrina DP4+) y por tanto aumentar la cantidad de azúcares fermentables. No obstante, la mejor realización es claramente la pululanasa NS26062 (PUL C), que redujo la cantidad de azúcares no fermentables relativos a la cantidad de enzimas añadidas mucho más que la pululanasa 400 L y la pululanasa D2. Esta es una demostración clara de la ventaja del uso de PULC termoestable. Es además demostrado que un DP4+ inferior a 20%, que corresponde a más del 80% de glucosa, maltosa y maltotriosa se puede alcanzar en 120 minutos de maceración.

10 [0165] Así la elección de pululanasa es importante para controlar la cantidad de azúcares fermentables y para probablemente reducir las dextrinas DP4+ no fermentables. Esto es importante desde un buen perfil de azúcar (muchos azúcares fermentables en comparación con azúcares no fermentables) promueven una buena fermentación del mosto.

Ejemplo 4

15 [0166] El propósito de este ejemplo fue evaluar el efecto de la pululanasa NS26062 en la formación de DP2 (maltosa) en el mosto. Una molienda que comprende 100% de cebada no malteada se preparó como se ha descrito anteriormente.

[0167] A todas las copas se les añadió luego 50 ppm Na_2SO_3 + 3,0 ml 1 M H_3PO_4 y enzimas:

20 α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g,
 β -glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max/Viscoflow XL): 300 ppm 0,23 EGU/g,
 Proteasa (Neutrasa 0,8 L): 0,002 AU/g,

[0168] Pululanasa como se describe en la tabla 4:

25 [0169] La maceración fue realizada y a las copas se les añadió agua de ciudad hasta un total de 300 g después de la maceración. El macerado fue filtrado, y los resultados en la tabla 4 más abajo fueron obtenidos por análisis del mosto:

Tabla 4. 100% cebada: RDF, % y azúcar de mosto.

Dosificación enzimática	PUN/g (NS26062)	DP1 % de total	DP2 % de total	DP4+ % de total	RDF %
-	0	3,8	47,5	34,0	61,2
NS26062	0,1	3,8	48,2	32,0	63,2
NS26062	0,3	3,8	49,8	28,8	65,7
NS26062	0,5	3,7		26,4	68,6
NS26062	1	3,7	52,6	23,9	71,0
NS26062	2	3,6	55,6	20,1	74,3

30 [0170] La concentración de maltosa (DP2) fue aumentada mediante el aumento de la dosificación de NS26062 (PUL C), y el aumento en % de maltosa fue seguido de un aumento en la atenuación (RDF%). La fracción de dextrina (Análisis de HPLC DP4/4+) fue al mismo tiempo decreciente.

35 [0171] Solo β -amilasa de cebada podría producir maltosa en esta reacción, y NS26062 (PUL C) facilitó la acción de la beta-amilasa de cebada.

[0172] Así el NS26062 (PUL C) fue una pululanasa adecuada, proporcionando un mosto con alto RDF y glucosa baja.

Ejemplo 5

40 [0173] El propósito de este ejemplo fue evaluar las tres proteasas Neutrasa 0.8 L, Alcalase y Flavourzyme para desarrollo de FAN y formación de maltosa. Una molienda que comprende 100% de cebada no malteada se preparó como se ha descrito anteriormente. Luego a todas las copas (ensayos 1-3 más abajo) se les añadió enzimas como se indica en las tablas 5-7 más abajo. La maceración fue realizada y a las copas se les añadió agua de ciudad hasta un total de 300 g después de la maceración. El macerado fue filtrado, y los resultados en las tablas 5-7 fueron obtenidos por análisis del mosto:

Prueba 1:

50 [0174] A todas las muestras se les añadió: α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g, β -glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max): 300 ppm (0,23 EGU/g) y actividades diferentes de las proteasas Alcalasa y Neutrasa 0,8 L como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. FAN y % azúcar de mosto en dosificaciones diferentes de Alcalasa y Neutrasa 0.8 L (actividad enzimática por g ss de macerado)

Copa nº.	Alcalasa AU/g	Neutrasa 0.8 L AU/g	FAN mg/l/Plato	DP2 % de total	DP4/4+ % de total
1	-	-	5,05	42,2	37,4
2	-	0,0005	6,73	45,4	35,5
3	-	0,001	7,32	44,6	35,8
4	-	0,0015	7,92	46,5	34,4
5	-	0,002	8,33	46,0	34,7
6	-	0,003	9,00	46,1	34,6
7	0,001	0,002	8,59	46,1	34,6
8	0,002	0,002	8,38	45,9	34,7
9	0,0025	0,002	8,35	46,5	34,3
10	0,003	0,002	8,59	46,9	34,1
11	0,004	0,002	8,92	46,6	34,2
12	0,005	0,002	9,29	47,1	34,0

5 Prueba 2:

[0175] A todas las muestras se les añadió: α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g, β -glucanasa y xilanas (Ultraflo Max): 300 ppm (0,23 EGU/g), Flavourzyme: 0,1 LAPU/g, y las proteasas Alcalasa y/o neutrasa 0,8 L como en la tabla indicada 6.

10

Tabla 6. FAN y % azúcar de mosto a dosificaciones diferentes de Alcalasa y Neutrasa 0.8 L (actividad enzimática por g ss de macerado)

Copa nº.	Alcalasa AU/g	Neutrasa 0.8 L AU/g	FAN mg/l/Plato	DP2 % de total	DP4/4+ % de total
1	-	-	5,47	43,8	36,0
2	-	0,0005	6,75	46,4	34,3
3	-	0,001	7,20	47,5	33,7
4	-	0,0015	7,57	47,1	33,8
5	-	0,002	8,26	47,3	33,7
6	-	0,003	8,64	47,3	33,6
7	0,001	0,002	9,09	47,1	33,9
8	0,002	0,002	8,46	48,2	33,1
9	0,0025	0,002	8,64	47,9	33,4
10	0,003	0,002	8,49	47,3	33,8
11	0,004	0,002	8,96	47,5	33,6
12	0,005	0,002	10,15	47,4	33,7

Prueba 3:

15

[0176] A todas las muestras se les añadió: α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g, β -glucanasa y xilanas (Ultraflo Max): 300 ppm, 0,23 EGU/g, Flavourzyme: 0,1 LAPU/g, y las proteasas Alcalasa o Neutrasa 0,8 L como se indica en la tabla 7.

20

Tabla 7. FAN y % azúcar de mosto a dosificaciones diferentes de Alcalasa y Neutrasa 0.8 L (actividad enzimática por g ss de macerado)

Copa nº.	Alcalasa AU/g	Neutrasa 0.8 L AU/g	FAN mg/l/Plato	DP2 % de total	DP4/4+ % de total
1	-	-	5,24	44,8	35,3
2	0,001		5,37	44,8	35,3
3	0,002		5,02	44,6	35,4
4	0,0025		5,20	45,7	34,6
5	0,003		5,29	44,2	35,7
6	0,004		5,66	44,4	35,0
7	0,005		5,91	45,0	35,0
8	-	0,002	5,66	44,4	35,5
9	0,004	0,001	8,45	47,1	33,9
10	0,004	0,0015	8,96	47,7	33,4
11	0,004	0,002	9,65	48,3	33,0
12	0,004	0,003	10,25	48,7	32,6

[0177] Estos ejemplos claramente demuestran que la adición de las proteasas Alcalasa y Neutrasa pero no Flavorzyme tiene un efecto positivo en la generación de amino nitrógeno libre disponible particular (FAN) y que la Neutrasa tuvo el efecto más positivo en la generación de FAN. Así la elección de proteasa es un parámetro crítico para generación de FAN.

Ejemplo 6

[0178] Una molienda que comprende 0-90% de cebada no malteada se preparó como se ha descrito anteriormente. Luego a todas las copas se añadieron las enzimas β -glucanasa y xilanasa. La maceración fue realizada y a las copas se les añadió agua de ciudad a un total de 300 g después de la maceración. El macerado fue filtrado, y los resultados en la tabla 8 fueron obtenidos por análisis del mosto:

[0179] El siguiente experimento es demostrar el efecto en la turbidez (NTU) con el aumento de la cantidad de cebada no malteada, cuando solo se añade mezcla de enzimas de filtración β -glucanasa y xilanasa (UI-traflo Max 300 ppm).

Tabla 8. NTU cuando la cantidad en aumento de cebada de malta se sustituye con cebada no malteada, del 0 % de cebada no malteada al 90 % de cebada no malteada.

	% de cebada	NTU
1	0	19.8
2	8	19.7
3	16	15.3
4	24	12.4
5	32	12
6	40	10.2
7	48	10.8
8	56	8.43
9	64	10.9
10	72	21
11	80	35.7
12	90	56.2

[0180] El resultado está también mostrado en la figura 1. Es evidente de este experimento que el macerado de cebada no malteada con mezclas de enzimas simples (sólo enzimas de filtración) se vuelve cada vez más difícil con cantidad en aumento de cebada no malteada se sustituye por cebada malteada y cuando la cantidad excede 80 % la turbidez es tan alta que el mosto es difícil de filtrar. Así cuando se tiene alta cantidad de cebada no malteada solo la adición de enzimas de filtración no es suficiente para obtener un mosto que es filtrable.

Ejemplo 7

[0181] El propósito de este ejemplo fue evaluar la turbidez (NTU) y la filtración de mosto de 100% maceración de infusión de cebada con una dosificación diferente de Lipopan F, Lipopan X y β -glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max). El estudio comprendió dos ensayos independientes para Lipopan F y Lipopan X, respectivamente, es decir 2 x 12 copas como se indica en la tabla 9 más abajo. Una molienda que comprende 100% de cebada no malteada se preparó como se describe previamente. Luego a todas las copas se les añadió enzimas.

[0182] A cada copa se añadió:

- 3.0 ml 1 M H_3PO_4 .
- 0.3 KNU(S)/g α -amilasa (Termamyl SC),
- 0.002 AU/g proteasa (Neutrasa 0.8 L),
- 0.5 PUN/g de pululanasa (NS26062), y las enzimas en la tabla 9.

[0183] La maceración fue realizada y a las copas se les añadió agua de ciudad hasta un total de 300 g después de la maceración. El macerado fue filtrado, y los resultados en la tabla 9 más abajo fueron obtenidos por análisis del mosto:

Tabla 9. Dosis de enzima actividad/g SS en la maceración

Copa n°.	Ultraflo EGU/g	Max	Lipopan LU/g	F	Lipopan LU/g	X	NTU	Filtración ml/10 min	Filtración ml final
1	0,24		-				116	105	194
2	0,24		1				120	86,0	165
3	0,24		5				78,3	110	195
4	0,24		10				66,1	131	195
5	0,24		20				50,1	168	210
6	0,24		50				22,7	190	210
7	0,16		50				19,7	170	208

8	0,08	50		19,8	178	205
9	-	50		18,5	142	195
10	0,16	10		67,8	114	200
11	0,08	10		69,2	130	200
12	-	10		49,7	95	180
1	0,24		-	110	105	200
2	0,24		1	92,0	70,0	165
3	0,24		5	50,0	100	200
4	0,24		10	107	94,0	198
5	0,24		20	5,91	135	205
6	0,24		50	3,36	160	210
7	0,16		50	3,53	150	205
8	0,08		50	3,84	151	205
9	-		50	4,96	100	200
10	0,16		10	24,9	110	200
11	0,08		10	21	110	200
12	-		10	8,9	75	180

[0184] Ambas lipasas Lipopan F y Lipopan X redujeron marcadamente la turbidez (NTU) del mosto. Lipopan X es la más eficaz (en la actividad enzimática LU(g)) para la reducción de la turbidez en el mosto, pero Lipopan F puede reducir la turbidez a un nivel en la especificación de mosto. La cantidad de enzimas de filtración se puede reducir a 100 ppm en presencia de lipasa sin reducir la velocidad de filtración significativamente.

Ejemplo 8

[0185] El propósito de este ejemplo fue evaluar el efecto de la proteasa Neutrasa 0,8L, fitasa y la pululanasa NS26062 (Pul C) en la generación de FAN y el perfil de azúcar de mosto en una maceración estándar. Una molienda que comprende 100% de cebada no malteada se preparó como se ha descrito anteriormente. Luego a todas las copas se les añadió α -amilasa (Termamyl SC) 0.3 KNU(S)/g, 300 ppm β -glucanasa y xilanas (Ultraflo Max), ajustadas a pH 5.3, y las enzimas proteasa Neutrasa 0.8, la fitasa y la pululanasa NS26062 (Pul C), se añadieron como se indica en las Tablas 10A y 10B más abajo, y los resultados obtenidos:

Tabla 10A. 100% cebada: generación de FAN en el mosto. Las dosificaciones es la unidad de actividad enzimática y ppm (100 ppm=100g/1000 kg cebada no malteada). FYT es unidad de fitasa, PUN es actividad de pululanasa y AU es actividad proteolítica.

Dosificaciones enzimáticas	FAN mg//Plato
0	5,09
1,5 FYT	5,09
0,5 PUN	5,11
1,5 FYT + 0,5 PUN	5,22
0,002 AU	8,58
0,002 AU + 1,5 FYT	7,53
0,002 AU + 0,5 PUN	7,85
0,002 AU + 1,5 FYT + 0,5 PUN	7,91
0,002 AU + 0,5 PUN + 0,5 FYT	7,87
0,002 AU + 0,5 PUN + 5 FYT	7,77
0,001 AU + 0,5 PUN + 5 FYT	7,35

Tabla 10B. 100% cebada: perfil de azúcar de mosto.

Dosificación enzimática Neutrasa 0.8 L (AU)	DP1 %	DP2 %	DP3 %	DP4/4+ %	Fru %
0	4,15	31,80	14,82	38,13	1,82
0,002 AU	3,81	46,61	12,79	34,97	1,82
1,5 FYT	4,13	42,11	14,78	37,14	1,85
0,5 PUN	4,06	44,28	18,28	31,55	1,82
0	4,15	31,80	14,82	38,13	1,82
5,0 FYT + 0,5 PUN	4,14	47,01	18,17	28,82	1,86
5,0 FYT + 0,5 PUN + 0,001 AU	3,84	50,67	17,42	26,25	1,80
5,0FYT+0,5PUN+ 0,002 AU	3,88	49,26	17,61	27,41	1,83
0	4,15	31,80	14,82	38,13	-
0,002 AU	3,81	46,61	12,79	34,97	-
0,002 AU + 0,5 PUN	3,81	47,78	17,74	28,87	-
0,002 AU + 0,5 PUN + 0,5 FYT	3,88	49,26	17,61	27,41	-
0,002 AU + 0,5 PUN + 1,5 FYT	3,91	50,12	17,56	26,58	-
0,001 AU + 0,5 PUN + 5,0 FYT	3,84	50,67	17,42	26,25	-

[0186] Tabla 10 A muestra que la proteasa aumenta FAN en el mosto, y tabla 10 B muestra que cuando se añade fitasa y pululanasa a la proteasa una cantidad alta comparable de DP1-DP3 podría ser generada con concentraciones de proteasa de 0,001 y 0,002 AU respectivamente. Así la concentración de proteasa podría ser reducida en la producción de mosto de maltosa cuando la fitasa y pululanasa está presente sin reducir la cantidad de azúcares fermentables (DP1-DP3).

Ejemplo 9

[0187] El propósito de este ejemplo fue dilucidar algunos parámetros generales referentes al mosto preparado en 100% de cebada no malteada para identificar cuestiones fundamentales en comparación con el mosto preparado en la cebada malteada.

[0188] Maceración de malta (100%) sin enzima añadida y maceración de cebada no malteada (100%), con mezcla enzimática. El mosto fue hervido, y la fermentación de cerveza fue realizada con 100% de malta (cebada) y un 100% de mosto de cebada no malteada.

Datos:

[0189] Maceración:

Cebada: escarlata y malta del mismo lote de escarlata.

Macerado: 10 kg de malta o cebada, + 35 l de licor de macerado y burbujeos 25 l hasta un total de 60 L.

Perfil: 54°C 30 minutos, aumento a 64°C (1 °C/minuto) y mantener durante 60 minutos, aumentar a 80°C (1 °C/minuto) y mantener durante 10 minutos y transferir para filtración.

[0190] Mezcla de enzimas en 100% de macerado de cebada:

α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g ss

β -glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max): 300 ppm

Proteasa (Neutrasa 0.8 L): 0,0015 AU/g ss

Pululanasa (NS26062, Pul C): 1,0 PUN/g ss

[0191] Composición del aminoácido de mosto (Tabla 11) analizado:

[0192] El aminoácido libre analizado en el mosto se organiza según el papel "Elucidation of the Role of Nitrogenous Wort Components in yeast Fermentation," (J. Inst. Brew. 113(1), 3-8,2007)

Tabla 11. FAN en el mosto

	Mosto de cebada malteado	Mosto de cebada no malteado
Grupo A, absorción rápida:	nM	nM
ácido aspártico	0,076	0,151
ácido glutámico	0,244	0,210
Asparagina	0,310	0,273
Serina	0,007	0,187
Glutamina	0,074	0,048
Treonina	0,210	0,188
Arginina	0,149	0,265
Lisina	0,216	0,354
Suma	1,286	1,675 (130%)
Grupo B, absorción intermedia:		
Valina	0,245	0,252
Metionina	0,047	0,111
Leucina	0,236	0,446
Isoleucina	0,114	0,163
Histidina	0,157	0,091
Suma	0,798	1,064 (133%)
Grupo C, absorción lenta:		
Glicina	0,149	0,158
Fenilalanina	0,196	0,206
Tirosina	0,131	0,158
Triptófano	0,087	0,062
Alanina	0,312	0,361
Suma	0,875	0,945 (108%)

Grupo D, poca o ninguna absorción

Prolina	2,500	0,413 (16,5%)
Total - suma	5,458	4,098

[0193] Tabla 11 muestra que cuando la maceración con 100 % cebada no malteada y una mezcla enzimática que comprende actividad de α -amilasa, actividad de β -glucanasa, actividad de proteasa y una actividad de pululanasa un mosto se puede producir que tiene considerablemente menos que para la prolina de aminoácido inutilizable de levadura, que es claramente ventajosa puesto que la presencia de este aminoácido en un producto de cerveza da un sabor desagradable. Además, la cantidad de aminoácidos en los grupos A y B, que podría ser rápidamente metabolizada por la levadura, es considerablemente aumentada cuando la maceración de cebada no malteada y la mezcla enzimática que comprende actividad de α -amilasa, actividad β -glucanasa, actividad de proteasa y una pululanasa. Así está claro de este ejemplo que la concentración de prolina es inferior a 2 mM, y la concentración de serina y de metionina está por encima de 0,1 mM y 0,05 mM respectivamente.

Ejemplo 10

[0194] El siguiente experimento analiza el mosto obtenido de molienda comprendiendo el 100 % de cebada no malteada y 100 % de malta. Los ensayos han sido ejecutados en Ziemann GmbH, Ludwigburg, Alemania. Todo análisis ha sido hecho según el Analytica EBC o MEBAK respectivamente. (van Erde, P., Analytica-EBC. 1998, Nürnberg: Verlag Hans Carl.; Anger, H., MEBAK Band Rohstoffe. 1. Auflage ed. Brautechnische Analysenmethoden. 2006, Freising: Selbstverlag der MEBAK).

[0195] La cebada usada fue una cebada de primavera de dos carreras de cosecha de Alemania 2008.

[0196] Las enzimas añadidas fueron:

α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g cereal
 β -glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max): 300 ppm
 Proteasa (Neutrasa 0.8 L): 0.001 AU/g ss
 Pululanasa (NS26062, Pul C): 2.0 PUN/g ss
 Lipasa (Lipozyme TL 100): 20 LU/g ss

[0197] El perfil de maceración usado fue 54 °C a 30 min; aumentar la temperatura 1°C/min hasta 64°C y reposar durante 60 min aumentar la temperatura 1°C/min hasta 78 °C y reposar durante 30min, tiempo de maceración total 144 min.

Tabla 12 Composición de mosto de 100 % de fermentaciones de cebada en comparación con todas las especificaciones de malta

Análisis	Unidad	Método	100% cebada no malteada	100 % cebada malteada
Viscosidad (1,2 %)	MPas	MEBAK II	1,76	< 1.8
Valor de yodo		MEBAK II	0,28	< 0.35
RDF	%	MEBAK II	69,2	68- 72
sol Nitrógeno (12 %)	Mg/100 ml	MEBAK II	102,5	
FAN (12 %)	ppm	MEBAK II	180	
Turbidez	EBC	MEBAK II	< 80 NTU	< 80 NTU

[0198] Los resultados muestran 100 % de cebada no malteada en combinación con la mezcla enzimática que comprende actividad de α -amilasa, actividad de β -glucanasa, actividad proteolítica y actividad desramificante de pululanasa puede completamente corresponder con toda la especificación de malta en todos los parámetros clave como viscosidad, turbidez, suministro de amino nitrógeno libre, rendimiento y atenuación final están dentro de todas las especificaciones de malta (100 % malta).

[0199] El rendimiento de filtración fue también investigado. La turbidez en el mosto de filtración describe la calidad del rendimiento de filtración. El componente de lipasa en la mezcla enzimática fue capaz de reducir el nivel de neblina más alto normalmente significativo de métodos de cebada no malteada hasta niveles de opacidad por debajo de 80 NTU dentro de un tiempo de filtración comparable.

[0200] También el rendimiento de fermentación fue evaluado: 8 hl de mosto de 100 % malta y 8 hl de mosto de 100 % de cebada no malteada fueron fermentados. El resultado se demuestra en figura 2.

[0201] Ambos mostos han sido fermentados con cepa de levadura de fermentación de fondo W34, La Figura 2 muestra la caída de extracto comparable de ambas fermentaciones. Además, no se encontraron diferencias en la producción de etanol.

[0202] Finalmente la cerveza de cebada ha sido probada por un grupo profesional de catadores en el instituto para

tecnología de elaboración de cerveza 1 en Weihenstephan, Alemania. Los resultados muestran el resultado comparable a una cerveza estándar de fermentación baja con indicaciones de estabilidad de sabor mejorada.

Tabla 13. Evaluación de sabor Weihenstephan de 100 % cerveza de cebada no malteada

	100 % cebada no malteada	100 % cebada no malteada	100 % cebada no malteada	100 % cebada no malteada
	Fresco	Envejecido forzado	Fresco	Envejecido forzado
Sabor	4,0	3,5	3,8	3,5
Sabor	4,0	3,4	3,8	3,4
Cuerpo	4,0	3,8	4,0	3,8
Total de amargura	4,1	3,9	4,1	3,9
Total	4,03	3,61	3,91	3,56

5

Evaluación General: DLG 5 = muy buena, 1 inaceptable.

Ejemplo 11

10

[0203] Los siguientes ejemplos fueron para evaluar parámetros importantes diferentes cuando la maceración en una molienda que comprende 30% de molienda de maíz o arroz (no malteado) con 70% de macerado principal de cebada no malteada y una mezcla enzimática que comprende actividad α -amilasa, actividad de β -glucanasa, actividad de proteasa y una pululanasa.

15

[0204] El proceso usado fue maceración, decocción donde el arroz o parte de molienda de maíz fueron hervidos con α -amilasa termoestable y luego mezclados con el macerado que comprende cebada no malteada. Las enzimas añadidas al 70% de macerado de cebada + 30 % de molienda de maíz o arroz:

α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g ss

β -glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max): 300 ppm (0,23 EGU/g)

20

Proteasa (Neutrasa 0.8 L): 0,001 y 0,002 AU/g ss

[0205] Pululanasa fue también añadida al macerado de cebada no malteado y la concentración fue variada, ver tabla 14 y 15, la pululanasa añadida es (NS26062, Pul C).

25

[0206] La maceración fue realizada de la siguiente manera: la cebada molida se añadió a la maceración, la copa (40,0 g como está) y se añadieron 115 g de agua a 60°C, CaCl (330 g/1000 kg cebada) se añadió además con la mezcla enzimática indicada arriba. La mezcla fue mantenida a 54°C durante 30 minutos, luego se agregó el macerado de decocción (15,4 g ss) y la temperatura fue mantenida a 64°C en 60 minutos, aumentada a 80°C y mantenida 10 minutos, enfriada y filtrada. Todas las maceraciones podrían ser filtradas sin problema ni ninguna diferencia significativa entre la dosificación de enzimas diferentes.

30

[0207] La preparación del macerado de decocción fue realizada de la siguiente manera: el arroz o molienda de maíz fue mezclado con agua (5,66 parte) a una temperatura de 60°C - 70°C, CaCl₂ (220 g/1000 kg molienda) fue añadido además con una α -amilasa (Termamyl SC 0,600 kg/1000 kg molienda). La mezcla fue calentada a 85°C y mantenida a esta temperatura durante 20 minutos, el calor fue aumentado 100°C (de ebullición) y mantenido a esta temperatura (hirviendo) durante 15 minutos. La mezcla fue enfriada a 80°C y mezclada con el macerado que contiene cebada.

35

[0208] La maceración fue realizada y a las copas se les añadió agua de ciudad hasta un total de 300 g después de la maceración. El macerado fue filtrado, y los resultados en la Tabla 14 más abajo fueron obtenidos por análisis del mosto. En algunos ejemplos el mosto fue hervido 10 minutos diluido 9.7 Plato y fermentado por fermentación forzada, Analytica - EBC nr. 8.6.

40

Tabla 14: FAN, RDF y contenido de azúcar de un mosto de macerado basado en decocción de 30 % molienda de maíz y 70 % de macerado de cebada no malteada que se mezclan.

Copa N°	Neutrasa AU/g	NS26 062 PUN / 9	Perfil de carbohidrato de mosto en%				Plato°	FAN ppm	RDF%
			DP1:	DP2:	DP3:	DP4+:			
1	0,001	-	5,17	54,31	12,02	28,50	14,48	106	64,4
2	0,001	0,5	5,47	58,23	14,73	21,56	14,45	106	70,7
3	0,001	1,0	5,48	60,48	15,79	18,25	14,54	107	73,6
4	0,001	1,5	5,59	61,77	16,35	16,29	14,45	107	75,3
5	0,001	2,0	5,57	62,88	16,66	14,89	14,49	108	76,5
6	0,001	2,5	5,60	63,35	16,96	14,09	14,46	106	77,2
7	0,002	-	5,54	54,29	12,50	27,67	14,28	131	64,6
8	0,002	0,5	5,60	58,37	15,13	20,90	14,34	131	70,8
9	0,002	1,0	5,53	60,43	16,10	17,93	14,83	129	73,8

10	0,002	1,5	5,66	61,83	16,58	15,93	14,34	130	75,3
11	0,002	2,0	5,66	62,71	16,92	14,70	14,33	131	76,4
12	0,002	2,5	5,73	63,21	17,18	13,88	14,31	130	77,3

Tabla 15: FAN, RDF y contenido de azúcar de un mosto de macerado basado en decocción del 30 % de molienda de arroz y 70 % de macerado de cebada no malteada que se mezclan.

Copa nº	Neutrassa AU/g	NS26 062 PUN / g	Perfil de carbohidrato de mosto en %				Plato°	FAN ppm	RDF%
			DP1:	DP2:	DP3:	DP4+:			
1	0,001	-	5,37	53,14	12,33	29,16	14,37	103	62,0
2	0,001	0,5	5,40	57,06	15,03	22,50	14,75	104	68,8
3	0,001	1,0	5,57	59,18	16,02	19,24	14,53	106	72,1
4	0,001	1,5	5,57	60,72	16,65	17,15	14,61	1,04	74,1
5	0,001	2,0	5,59	61,64	17,00	15,77	14,51	104	75,5
6	0,001	2,5	5,65	62,38	17,28	14,67	14,52	105	76,6
7	0,002	-	5,50	53,23	12,79	28,48	14,45	125	62,4
8	0,002	0,5	5,55	57,09	15,28	22,08	14,45	124	69,0
9	0,002	1,0	5,65	59,17	16,32	18,86	14,44	126	72,1
10	0,002	1,5	5,68	60,38	16,95	16,99	14,45	127	73,9
11	0,002	2,0	5,67	61,37	17,38	15,58	14,45	126	75,3
12	0,002	2,5	5,72	62,11	17,56	14,59	14,39	127	76,7

- 5 [0209] Tabla 14 y 15 muestran el perfil de azúcar, Plato, FAN y RDF del mosto basado en maceración de una molienda que comprende 30 % de maíz o arroz y 70 % de cebada no malteada (100 % granos no malteados). El resultado muestra claramente que la cantidad de azúcares fermentables (DP1-3) es muy alta (encima del 80 %), el RDF está por encima del 60 % y en aumento con concentración de pululanasa en aumento y FAN es alto y en aumento con concentración de proteasa en aumento, cuando el mosto se produce del 100 % de granos no malteados comprendiendo 70 % de cebada no malteada y 30 % de molienda de maíz no malteada o arroz y una mezcla enzimática que comprende actividad de α -amilasa, actividad de β -glucanasa, actividad de proteasa y una pululanasa. No había ninguna diferencia significativa entre usar arroz o molienda de maíz.

Ejemplo 12

- 15 [0210] Los siguientes ejemplos fueron para evaluar parámetros importantes diferentes en la maceración en una molienda que comprende 50% cebada + 50% macerado de trigo y las siguientes enzimas.

α -amilasa (Termamyl SC): 0,3 KNU(S)/g ss (sustancia seca)

β -glucanasa y xilanasa (Ultraflo Max): 300 ppm/0,23 EGU/g ss

- 20 Proteasa (Neutrassa): 0,001 AU/g ss

Lipasa (Lipozyme TL): 20 LU/g ss

Pululanasa (NS26062, Pul C): 0-3,0 PUN/g ss

- 25 [0211] En un ejemplo la concentración de pululanasa fue variada, ver tabla 17, la pululanasa añadida es (NS26062, Pul C).

[0212] En los otros dos ejemplos la concentración de mezcla enzimática pr kg de materia prima fue variada, ver tabla 18.

- 30 [0213] El macerado se preparó mediante la mezcla de cebada molida y trigo (25 g de cada uno (total 50,0 g) con 200 g de agua añadido a las copas de maceración, luego Ca^{2+} y la mezcla enzimática arriba indicada fueron añadidas y la maceración comenzó.

- 35 [0214] El perfil de maceración fue de la siguiente manera: el macerado fue calentado a 54°C (1°C/min.) y mantenido a esa temperatura durante 30 minutos, la temperatura fue aumentada a 64°C dentro de 10 minutos y mantenido a esa temperatura durante 45 minutos, la temperatura fue aumentada a 80°C dentro de 16 minutos y mantenido a esa temperatura durante 10 minutos. Agua hasta 300 g total fue añadido y el macerado fue filtrado.

- [0215] El mosto fue filtrado y en algunos ejemplos el mosto fue hervido 10 minutos diluido 9,7 Plato y fermentado por fermentación forzada.

- 40 [0216] Los resultados se muestran en la figura 3 y en la tabla 16 y 17.

Tabla 16: la mezcla enzimática fue como se ha descrito anteriormente Termamyl SC, Ultraflo Max, Neutrassa, y Lipozyme TL con concentraciones diferentes (PUN/g) de pululanasa (NS26062) añadidas.

Enzimas	Filtración		Plato	pH	NTU	RDF%
	ml después 10 minutos	ml total				

0 PUN/g + mezcla enzimática	158	208	12,96	5,80	4	64,2
0,5 PUN/g + mezcla enzimática	179	215	12,84	5,70	4	69,8
1,0 PUN/g + mezcla enzimática	159	206	13,06	5,70	3	72,0
1,5 PUN/g + mezcla enzimática	154	213	13,08	5,70	3	72,5
2,0 PUN/g + mezcla enzimática	159	209	13,05	5,50	3	73,0
2,5 PUN/g + mezcla enzimática	146	206	13,10	5,6	3	73,4
3,0 PUN/g + mezcla enzimática	159	208	13,08	5,70	3	73,6

[0217] Tabla 16 muestra que un mosto hecho de una molienda que comprende 50 % de trigo y 50 % de cebada, es decir 100 % de granos no malteados y molidos con una mezcla enzimática que comprende actividad de α -amilasa, actividad de β -glucanasa, actividad de proteasa, actividad de lipasa y una pululanasa es filtrable y con turbidez baja y de manera importante el RDF es alto (por encima de 65 %) y en aumento con cantidad en aumento de pululanasa NS26062 (Pul C).

[0218] En la tabla 17 la mezcla enzimática fue como se ha descrito anteriormente Termamyl SC, Ultraflo Max, Neutrasa, y Lipozyme TL en la misma cantidad relativa, pero en este ejemplo la cantidad de la mezcla con respecto a la cantidad de materia prima fue variada. A todas las mezclas se añadió 1.0 PUN de pululanasa (NS26062).

Tabla 17: Dosis diferentes de mezcla de enzima

Enzimas	Filtración		Ml total	pH	NTU	RDF%
	Ml después 10 minutos	Ml total				
100% mezcla enzimática	159	206	13.06	5.70	3	72.0
125% mezcla enzimática	169	208	13.12	5.70	4	72.0
150% mezcla enzimática	164	204	13.12	5.70	3	72.4
175% mezcla enzimática	145	204	13.06	5.70	3	72.9
200% mezcla enzimática	147	205	13.10	5.70	3	72.9
300% mezcla enzimática	150	204	13.21	5.70	3	73.5

[0219] Con todas las cantidades evaluadas de la mezcla enzimática que comprende actividad de α -amilasa, actividad de β -glucanasa, actividad de proteasa, actividad de lipasa y una pululanasa el mosto producido tiene una cantidad muy alta de RDF por encima del 70%, estaba aumentando ligeramente con cantidades en aumento de mezcla enzimática. No obstante, un alto RDF y buena filtrabilidad se obtuvo con 2 kg/1000 kg de mezcla enzimática / materia prima, que correspondía a 100 % de mezcla enzimática. De manera importante el tiempo de maceración total fue 2 horas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0220]

<110> Novozymes A/S

<120> Proceso de elaboración de cerveza

<130> 11310-000

<160> 10
 <170> Versión de patentIn 3.5
 5 <210> 1
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> variante
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Termamyl SC
 <400> 1
 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
 1 5 10 15
 Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
 20 25 30
 Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
 35 40 45
 Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
 50 55 60
 Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Ala Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
 65 70 75 80
 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
 85 90 95
 Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
 100 105 110
 Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
 115 120 125
 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
 130 135 140
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
 145 150 155 160
 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175

ES 2 542 353 T3

Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Phe Gly
 180 185 190
 Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro Glu
 195 200 205
 Val Val Thr Glu Leu Lys Ser Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr Thr
 210 215 220
 Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser
 225 230 235 240
 Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Asp Val Arg Ser Gln Thr Gly Lys Pro
 245 250 255
 Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys Leu His
 260 265 270
 Asn Tyr Ile Met Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala Pro
 275 280 285
 Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Thr Phe Asp
 290 295 300
 Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln Ala Leu
 325 330 335
 Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile
 340 345 350
 Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr
 355 360 365
 Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile Asp Pro
 370 375 380
 Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val Thr Glu
 405 410 415
 Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val Phe Tyr
 435 440 445

ES 2 542 353 T3

Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser Asp Gly
450 455 460

Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp Val Pro
465 470 475 480

Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Trp Ser Ile Thr Thr Arg Pro
485 490 495

Trp Thr Asp Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val Ala Trp
500 505 510

<210> 2

<211> 921

<212> PRT

5 <213> Bacillus acidopulluliticus

<220>

<221> misc_feature

<223> Promozyme 400L

10

<400> 2

Asp Ser Thr Ser Thr Lys Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp Ser
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Asn Trp Asp Val Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Gln Phe Thr Gly Thr Asn Asp Asp Phe Gly
35 40 45

Ala Val Ala Asp Thr Gln Val Pro Gly Asp Asn Thr Gln Val Gly Leu
50 55 60

Ile Val Arg Lys Asn Asp Trp Ser Glu Lys Asn Thr Pro Asn Asp Leu
65 70 75 80

His Ile Asp Leu Ala Lys Gly His Glu Val Trp Ile Val Gln Gly Asp
85 90 95

Pro Thr Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Ile Pro
100 105 110

Ser Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Asp Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys
115 120 125

Leu Ser Met Pro Met Thr Leu Ala Asp Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val
130 135 140

Ile Asp Lys Thr Thr Gly Glu Lys Ile Pro Val Thr Ser Ala Val Ser
145 150 155 160

ES 2 542 353 T3

Ala Asn Pro Val Thr Ala Val Leu Val Gly Asp Leu Gln Gln Ala Leu
165 170 175

Gly Ala Ala Asn Asn Trp Ser Pro Asp Asp Asp His Thr Leu Leu Lys
180 185 190

Lys Ile Asn Pro Asn Leu Tyr Gln Leu Ser Gly Thr Leu Pro Ala Gly
195 200 205

Thr Tyr Gln Tyr Lys Ile Ala Leu Asp His Ser Trp Asn Thr Ser Tyr
210 215 220

Pro Gly Asn Asn Val Ser Leu Thr Val Pro Gln Gly Gly Glu Lys Val
225 230 235 240

Thr Phe Thr Tyr Ile Pro Ser Thr Asn Gln Val Phe Asp Ser Val Asn
245 250 255

His Pro Asn Gln Ala Phe Pro Thr Ser Ser Ala Gly Val Gln Thr Asn
260 265 270

Leu Val Gln Leu Thr Leu Ala Ser Ala Pro Asp Val Thr His Asn Leu
275 280 285

Asp Val Ala Ala Asp Gly Tyr Lys Ala His Asn Ile Leu Pro Arg Asn
290 295 300

Val Leu Asn Leu Pro Arg Tyr Asp Tyr Ser Gly Asn Asp Leu Gly Asn
305 310 315 320

Val Tyr Ser Lys Asp Ala Thr Ser Phe Arg Val Trp Ala Pro Thr Ala
325 330 335

Ser Asn Val Gln Leu Leu Leu Tyr Asn Ser Glu Lys Gly Ser Ile Thr
340 345 350

Lys Gln Leu Glu Met Gln Lys Ser Asp Asn Gly Thr Trp Lys Leu Gln
355 360 365

Val Ser Gly Asn Leu Glu Asn Trp Tyr Tyr Leu Tyr Gln Val Thr Val
370 375 380

Asn Gly Thr Thr Gln Thr Ala Val Asp Pro Tyr Ala Arg Ala Ile Ser
385 390 395 400

Val Asn Ala Thr Arg Gly Met Ile Val Asp Leu Lys Ala Thr Asp Pro
405 410 415

Ala Gly Trp Gln Gly Asp His Glu Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp
420 425 430

Glu Val Ile Tyr Glu Ala His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn

ES 2 542 353 T3

435					440					445					
Ser	Gly 450	Met	Lys	Asn	Lys	Gly 455	Lys	Tyr	Leu	Ala	Phe 460	Thr	Glu	His	Gly
Thr 465	Lys	Gly	Pro	Asp	His 470	Val	Lys	Thr	Gly	Ile 475	Asp	Ser	Leu	Lys	Glu 480
Leu	Gly	Ile	Thr	Thr 485	Val	Gln	Leu	Gln	Pro 490	Val	Glu	Glu	Phe	Asn 495	Ser
Ile	Asp	Glu	Thr 500	Gln	Pro	Asp	Thr	Tyr 505	Asn	Trp	Gly	Tyr	Asp 510	Pro	Arg
Asn	Tyr	Asn 515	Val	Pro	Glu	Gly	Ala 520	Tyr	Ala	Thr	Thr	Pro 525	Glu	Gly	Thr
Ala	Arg 530	Ile	Thr	Glu	Leu	Lys 535	Gln	Leu	Ile	Gln	Ser 540	Leu	His	Gln	Gln
Arg 545	Ile	Gly	Val	Asn	Met 550	Asp	Val	Val	Tyr	Asn 555	His	Thr	Phe	Asp	Val 560
Met	Val	Ser	Asp	Phe 565	Asp	Lys	Ile	Val	Pro 570	Gln	Tyr	Tyr	Tyr	Arg 575	Thr
Asp	Ser	Asn	Gly 580	Asn	Tyr	Thr	Asn	Gly 585	Ser	Gly	Cys	Gly	Asn 590	Glu	Phe
Ala	Thr	Glu 595	His	Pro	Met	Ala	Gln 600	Lys	Phe	Val	Leu	Asp 605	Ser	Val	Asn
Tyr	Trp 610	Val	Asn	Glu	Tyr	His 615	Val	Asp	Gly	Phe	Arg 620	Phe	Asp	Leu	Met
Ala 625	Leu	Leu	Gly	Lys	Asp 630	Thr	Met	Ala	Lys	Ile 635	Ser	Asn	Glu	Leu	His 640
Ala	Ile	Asn	Pro	Gly 645	Ile	Val	Leu	Tyr	Gly 650	Glu	Pro	Trp	Thr	Gly 655	Gly
Thr	Ser	Gly	Leu 660	Ser	Ser	Asp	Gln	Leu 665	Val	Thr	Lys	Gly	Gln 670	Gln	Lys
Gly	Leu	Gly 675	Ile	Gly	Val	Phe	Asn 680	Asp	Asn	Ile	Arg	Asn 685	Gly	Leu	Asp
Gly	Asn 690	Val	Phe	Asp	Lys	Thr 695	Ala	Gln	Gly	Phe	Ala 700	Thr	Gly	Asp	Pro
Asn 705	Gln	Val	Asp	Val	Ile 710	Lys	Asn	Gly	Val	Ile 715	Gly	Ser	Ile	Gln	Asp 720

ES 2 542 353 T3

Phe Thr Ser Ala Pro Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp
725 730 735

Asn Met Thr Leu Trp Asp Lys Ile Leu Ala Ser Asn Pro Ser Asp Thr
740 745 750

Glu Ala Asp Arg Ile Lys Met Asp Glu Leu Ala His Ala Val Val Phe
755 760 765

Thr Ser Gln Gly Val Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg
770 775 780

Thr Lys Gly Gly Asn Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn
785 790 795 800

Gln Phe Asp Trp Ser Arg Lys Ala Gln Phe Lys Asp Val Phe Asp Tyr
805 810 815

Phe Ser Ser Met Ile His Leu Arg Asn Gln His Pro Ala Phe Arg Met
820 825 830

Thr Thr Ala Asp Gln Ile Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Glu Ser Pro
835 840 845

Thr Asn Thr Val Ala Phe Glu Leu Lys Asn Tyr Ala Asn His Asp Thr
850 855 860

Trp Lys Asn Ile Ile Val Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ser Gln Thr
865 870 875 880

Leu Asn Leu Pro Ser Gly Asp Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asp Gln
885 890 895

Ile Gly Glu Lys Ser Leu Gly His Val Met Gly Asn Val Gln Val Pro
900 905 910

Ala Ile Ser Thr Leu Ile Leu Lys Gln
915 920

<210> 3

<211> 300

5 <212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Neutrasa

<400> 3

Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser
1 5 10 15

ES 2 542 353 T3

Leu Asn Ile Ser Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser
 20 25 30
 Lys Pro Thr Gly Thr Gln Ile Ile Thr Thr Asp Leu Gln Asn Arg Glu
 35 40 45
 Tyr Asn Leu Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr
 50 55 60
 Thr Ser Ser Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly Lys
 65 70 75 80
 Val Tyr Asp Tyr Phe Tyr Gln Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn
 85 90 95
 Lys Gly Gly Lys Ile Val Ser Ser Val His Tyr Gly Ser Arg Tyr Asn
 100 105 110
 Asn Ala Ala Trp Ile Gly Asp Gln Met Ile Tyr Gly Asp Gly Asp Gly
 115 120 125
 Ser Phe Phe Ser Pro Leu Ser Gly Ser Met Asp Val Thr Ala His Glu
 130 135 140
 Met Thr His Gly Val Thr Gln Glu Thr Ala Asn Leu Asn Tyr Glu Asn
 145 150 155 160
 Gln Pro Gly Ala Leu Asn Glu Ser Phe Ser Asp Val Phe Gly Tyr Phe
 165 170 175
 Asn Asp Thr Glu Asp Trp Asp Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Ser Gln
 180 185 190
 Pro Ala Leu Arg Ser Leu Ser Asn Pro Thr Lys Tyr Gly Gln Pro Asp
 195 200 205
 Asn Phe Lys Asn Tyr Lys Asn Leu Pro Asn Thr Asp Ala Ala Ala Thr
 210 215 220
 Thr Gly Thr Gly Thr Thr Leu Lys Gly Lys Thr Val Ser Leu Asn Ile
 225 230 235 240
 Ser Ser Glu Ser Gly Lys Tyr Val Leu Arg Asp Leu Ser Lys Pro Thr
 245 250 255
 Gly Thr Gln Ile Ile Thr Tyr Asp Leu Gln Asn Arg Glu Tyr Asn Leu
 260 265 270
 Pro Gly Thr Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Gln Phe Thr Thr Ser Ser
 275 280 285
 Gln Arg Ala Ala Val Asp Ala His Tyr Asn Leu Gly
 290 295 300

<210> 4

<211> 451
<212> PRT
<213> Aspergillus aculeatus

5 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Shearzyme

 <400> 4

Met Val Gly Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Leu
 1 5 10 15
 Pro Asn Ile Val Ser Ala Val Gly Leu Asp Gln Ala Ala Val Ala Lys
 20 25 30
 Gly Leu Gln Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp
 35 40 45
 Ile Pro Tyr Val Thr Gln Leu Asn Asn Thr Ala Asp Phe Gly Gln Ile
 50 55 60
 Thr Pro Gly Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Phe Thr Phe Thr Lys Gly Asp Val Ile Ala Asp Leu Ala Glu Gly
 85 90 95
 Asn Gly Gln Tyr Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Thr Trp Thr Asn Ala Thr Leu Thr Ala
 115 120 125
 Ala Leu Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Ser His Tyr Lys Gly Lys
 130 135 140
 Cys Leu His Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr Thr Thr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro
 165 170 175
 Ile Ala Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Ala Lys Leu Phe
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Gly Ala Lys Ala Ala Ser Ala
 195 200 205
 Arg Ala Ile Val Gln Leu Val Lys Asn Ala Gly Ala Lys Ile Asp Gly

ES 2 542 353 T3

210											215											220			
Val 225	Gly	Leu	Gln	Ala	His 230	Phe	Ser	Val	Gly	Thr 235	Val	Pro	Ser	Thr	Ser 240										
Ser	Leu	Val	Ser	Val 245	Leu	Gln	Ser	Phe	Thr 250	Ala	Leu	Gly	Val	Glu 255	Val										
Ala	Tyr	Thr	Glu 260	Ala	Asp	Val	Arg	Ile 265	Leu	Leu	Pro	Thr	Thr 270	Ala	Thr										
Thr	Leu	Ala 275	Gln	Gln	Ser	Ser	Asp 280	Phe	Gln	Ala	Leu	Val 285	Gln	Ser	Cys										
Val	Gln 290	Thr	Thr	Gly	Cys	Val 295	Gly	Phe	Thr	Ile	Trp 300	Asp	Trp	Thr	Asp										
Lys 305	Tyr	Ser	Trp	Val	Pro 310	Ser	Thr	Phe	Ser	Gly 315	Tyr	Gly	Ala	Ala	Leu 320										
Pro	Trp	Asp	Glu	Asn 325	Leu	Val	Lys	Lys	Pro 330	Ala	Tyr	Asn	Gly	Leu 335	Leu										
Ala	Gly	Met	Gly 340	Val	Thr	Val	Thr	Thr 345	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr 350	Thr	Ala										
Thr	Ala	Thr 355	Gly	Lys	Thr	Thr	Thr 360	Thr	Thr	Thr	Gly	Ala 365	Thr	Ser	Thr										
Gly	Thr 370	Thr	Ala	Ala	His	Trp 375	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly 380	Leu	Asn	Trp	Ser										
Gly 385	Pro	Thr	Ala	Cys	Ala 390	Thr	Gly	Tyr	Thr	Cys 395	Thr	Tyr	Val	Asn	Asp 400										
Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys 405	Leu	Ser	Ile	Ala	Gln 410	Pro	Lys	Pro	Ala	Gly 415	Val										
Leu	Ala	Ile	Gln 420	Ser	Val	Arg	Phe	Ile 425	Tyr	His	Asn	Thr	Gln 430	Asn	Ser										
Leu	Leu	Asp 435	Leu	Lys	Lys	Lys	Thr 440	Leu	Glu	His	Thr	Gly 445	Gly	Arg	Ser										
Ser	Met 450	His																							

```
<210> 5
<211> 316
<212> PRT
```

<213> Fusarium oxysporum
<220>
<221> misc_feature
5 <223> Lipopan F
<400> 5

Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile
1 5 10 15

Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser
20 25 30

Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly
35 40 45

Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly
50 55 60

Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg
65 70 75 80

Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln
85 90 95

Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln
100 105 110

Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser
115 120 125

Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser
130 135 140

Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly
145 150 155 160

Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn
165 170 175

Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg
180 185 190

Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe
195 200 205

Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala
225 230 235 240

Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala
245 250 255

His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe
260 265 270

Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr
275 280 285

Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met
290 295 300

Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser
305 310 315

<210> 6

<211> 410

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> variante de fitasa de P. lycii

<220>

<221> misc_feature

<223> fitasa RONOZYME NP

<400> 6

Gln Leu Pro Ile Pro Ala Gln Asn Thr Ser Asn Trp Gly Pro Tyr Ser
 1 5 10 15
 Pro Phe Phe Pro Val Glu Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Glu Gly Cys Thr
 20 25 30
 Val Thr Gln Val Asn Leu Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Trp Pro Thr
 35 40 45
 Ser Gly Ala Arg Ser Arg Gln Val Ala Ala Val Ala Lys Ile Gln Met
 50 55 60
 Ala Arg Pro Phe Thr Asp Pro Lys Tyr Glu Phe Leu Asn Asp Phe Val
 65 70 75 80
 Tyr Thr Phe Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Phe Gly Ala Asn Gln Ser
 85 90 95
 Tyr Gln Thr Gly Thr Asp Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Thr Leu Phe Glu
 100 105 110
 Gly Gly Asp Val Pro Phe Val Arg Ala Ala Gly Asp Gln Arg Val Val
 115 120 125
 Asp Ser Ser Thr Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Asp Ala Ser Gly Glu
 130 135 140
 Thr Val Leu Pro Thr Leu Gln Val Val Leu Gln Glu Glu Gly Asn Cys

ES 2 542 353 T3

145 150 155 160
 Thr Leu Cys Asn Asn₁₆₅ Met Cys Pro Asn Trp₁₇₀ Val Lys Gly Asp Glu₁₇₅ Ser
 Thr Thr Trp Leu₁₈₀ Gly Val Phe Ala Pro₁₈₅ Asn Ile Thr Ala Arg₁₉₀ Leu Asn
 Ala Ala Ala₁₉₅ Pro Ser Ala Asn Leu₂₀₀ Ser Asp Ser Asp Ala₂₀₅ Leu Thr Leu
 Met Asp₂₁₀ Met Cys Pro Phe Asp₂₁₅ Thr Leu Ser Ser Gly₂₂₀ Asn Ala Ser Pro
 Phe Cys Asp Leu Phe Thr₂₃₀ Ala Glu Glu Tyr Thr₂₃₅ Ser Tyr Glu Tyr Tyr₂₄₀
 Tyr Asp Leu Asp Lys₂₄₅ Tyr Tyr Gly Thr Gly₂₅₀ Pro Gly Asn Ala Leu₂₅₅ Gly
 Pro Val Gln Gly₂₆₀ Val Gly Tyr Val Asn₂₆₅ Glu Leu Leu Ala Arg₂₇₀ Leu Thr
 Gly Gln Ala₂₇₅ Val Arg Asp Glu Thr₂₈₀ Gln Thr Asn Arg Thr₂₈₅ Leu Asp Ser
 Asp Pro₂₉₀ Ala Thr Phe Pro Leu₂₉₅ Asn Arg Thr Phe Tyr₃₀₀ Ala Asp Phe Ser
 His Asp Asn Thr Met Val₃₁₀ Ala Ile Phe Ala Ala₃₁₅ Leu Gly Leu Phe Asn₃₂₀
 Ala Thr Ala Leu Asp₃₂₅ Pro Leu Lys Pro Asp₃₃₀ Glu Asn Arg Leu Trp₃₃₅ Val
 Val Ser Lys Leu₃₄₀ Val Pro Phe Ser Gly₃₄₅ His Met Thr Val Glu₃₅₀ Lys Leu
 Ala Cys Ser₃₅₅ Gly Lys Glu Ala Val₃₆₀ Arg Val Leu Val Asn₃₆₅ Asp Ala Val
 Gln Pro₃₇₀ Leu Glu Phe Cys Gly₃₇₅ Gly Val Asp Gly Val₃₈₀ Cys Glu Leu Ser
 Ala Phe Val Glu Ser Gln₃₉₀ Thr Tyr Ala Arg Glu₃₉₅ Asn Gly Gln Gly Asp₄₀₀
 Phe Ala Lys Cys Gly₄₀₅ Phe Val Pro Ser Glu₄₁₀

<210> 7
 <211> 928
 <212> PRT

<213> Bacillus deramificans

<220>

<221> mat_peptide

5 <222> (1)..(928)

<400> 7

Asp Gly Asn Thr Thr Thr Ile Ile Val His Tyr Phe Arg Pro Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Tyr Gln Pro Trp Ser Leu Trp Met Trp Pro Lys Asp Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ala Glu Tyr Asp Phe Asn Gln Pro Ala Asp Ser Phe Gly Ala Val Ala
 35 40 45
 Ser Ala Asp Ile Pro Gly Asn Pro Ser Gln Val Gly Ile Ile Val Arg
 50 55 60
 Thr Gln Asp Trp Thr Lys Asp Val Ser Ala Asp Arg Tyr Ile Asp Leu
 65 70 75 80
 Ser Lys Gly Asn Glu Val Trp Leu Val Glu Gly Asn Ser Gln Ile Phe
 85 90 95
 Tyr Asn Glu Lys Asp Ala Glu Asp Ala Ala Lys Pro Ala Val Ser Asn
 100 105 110
 Ala Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gln Val Leu Val Lys Leu Ser Gln Pro
 115 120 125
 Leu Thr Leu Gly Glu Gly Ala Ser Gly Phe Thr Val His Asp Asp Thr
 130 135 140
 Ala Asn Lys Asp Ile Pro Val Thr Ser Val Lys Asp Ala Ser Leu Gly
 145 150 155 160
 Gln Asp Val Thr Ala Val Leu Ala Gly Thr Phe Gln His Ile Phe Gly
 165 170 175
 Gly Ser Asp Trp Ala Pro Asp Asn His Ser Thr Leu Leu Lys Lys Val
 180 185 190
 Thr Asn Asn Leu Tyr Gln Phe Ser Gly Asp Leu Pro Glu Gly Asn Tyr
 195 200 205
 Gln Tyr Lys Val Ala Leu Asn Asp Ser Trp Asn Asn Pro Ser Tyr Pro
 210 215 220
 Ser Asp Asn Ile Asn Leu Thr Val Pro Ala Gly Gly Ala His Val Thr
 225 230 235 240

ES 2 542 353 T3

Phe Ser Tyr Ile Pro Ser Thr His Ala Val Tyr Asp Thr Ile Asn Asn
 245 250 255
 Pro Asn Ala Asp Leu Gln Val Glu Ser Gly Val Lys Thr Asp Leu Val
 260 265 270
 Thr Val Thr Leu Gly Glu Asp Pro Asp Val Ser His Thr Leu Ser Ile
 275 280 285
 Gln Thr Asp Gly Tyr Gln Ala Lys Gln Val Ile Pro Arg Asn Val Leu
 290 295 300
 Asn Ser Ser Gln Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asp Asp Leu Gly Asn Thr Tyr
 305 310 315 320
 Thr Gln Lys Ala Thr Thr Phe Lys Val Trp Ala Pro Thr Ser Thr Gln
 325 330 335
 Val Asn Val Leu Leu Tyr Asp Ser Ala Thr Gly Ser Val Thr Lys Ile
 340 345 350
 Val Pro Met Thr Ala Ser Gly His Gly Val Trp Glu Ala Thr Val Asn
 355 360 365
 Gln Asn Leu Glu Asn Trp Tyr Tyr Met Tyr Glu Val Thr Gly Gln Gly
 370 375 380
 Ser Thr Arg Thr Ala Val Asp Pro Tyr Ala Thr Ala Ile Ala Pro Asn
 385 390 395 400
 Gly Thr Arg Gly Met Ile Val Asp Leu Ala Lys Thr Asp Pro Ala Gly
 405 410 415
 Trp Asn Ser Asp Lys His Ile Thr Pro Lys Asn Ile Glu Asp Glu Val
 420 425 430
 Ile Tyr Glu Met Asp Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Pro Asn Ser Gly
 435 440 445
 Met Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Leu Thr Glu Lys Gly Thr Lys
 450 455 460
 Gly Pro Asp Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Gln Leu Gly
 465 470 475 480
 Ile Thr His Val Gln Leu Met Pro Val Phe Ala Ser Asn Ser Val Asp
 485 490 495
 Glu Thr Asp Pro Thr Gln Asp Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr
 500 505 510

ES 2 542 353 T3

Asp Val Pro Glu Gly Gln Tyr Ala Thr Asn Ala Asn Gly Asn Ala Arg
 515 520 525
 Ile Lys Glu Phe Lys Glu Met Val Leu Ser Leu His Arg Glu His Ile
 530 535 540
 Gly Val Asn Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Ala Thr Gln Ile
 545 550 555 560
 Ser Asp Phe Asp Lys Ile Val Pro Glu Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Asp
 565 570 575
 Ala Gly Asn Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Thr Gly Asn Glu Ile Ala Ala
 580 585 590
 Glu Arg Pro Met Val Gln Lys Phe Ile Ile Asp Ser Leu Lys Tyr Trp
 595 600 605
 Val Asn Glu Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu
 610 615 620
 Leu Gly Lys Asp Thr Met Ser Lys Ala Ala Ser Glu Leu His Ala Ile
 625 630 635 640
 Asn Pro Gly Ile Ala Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser
 645 650 655
 Ala Leu Pro Asp Asp Gln Leu Leu Thr Lys Gly Ala Gln Lys Gly Met
 660 665 670
 Gly Val Ala Val Phe Asn Asp Asn Leu Arg Asn Ala Leu Asp Gly Asn
 675 680 685
 Val Phe Asp Ser Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Ala Thr Gly Leu
 690 695 700
 Thr Asp Ala Ile Lys Asn Gly Val Glu Gly Ser Ile Asn Asp Phe Thr
 705 710 715 720
 Ser Ser Pro Gly Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Tyr
 725 730 735
 Thr Leu Trp Asp Lys Ile Ala Leu Ser Asn Pro Asn Asp Ser Glu Ala
 740 745 750
 Asp Arg Ile Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Met Thr Ser
 755 760 765
 Gln Gly Val Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys
 770 775 780
 Gly Gly Asn Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ala Val Asn Glu Phe

ES 2 542 353 T3

785					790						795					800
Asp	Trp	Ser	Arg	Lys	Ala	Gln	Tyr	Pro	Asp	Val	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Ser	
				805					810					815		
Gly	Leu	Ile	His	Leu	Arg	Leu	Asp	His	Pro	Ala	Phe	Arg	Met	Thr	Thr	
			820					825					830			
Ala	Asn	Glu	Ile	Asn	Ser	His	Leu	Gln	Phe	Leu	Asn	Ser	Pro	Glu	Asn	
		835					840					845				
Thr	Val	Ala	Tyr	Glu	Leu	Thr	Asp	His	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	Trp	Gly	
	850					855					860					
Asn	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Asn	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ala	Thr	Ile	Asn	
865					870					875					880	
Leu	Pro	Ser	Gly	Lys	Trp	Ala	Ile	Asn	Ala	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	Gly	
				885					890					895		
Glu	Ser	Thr	Leu	Gly	Gln	Ala	Glu	Gly	Ser	Val	Gln	Val	Pro	Gly	Ile	
			900					905					910			
Ser	Met	Met	Ile	Leu	His	Gln	Glu	Val	Ser	Pro	Asp	His	Gly	Lys	Lys	
		915					920					925				

<210> 8

<211> 829

<212> PRT

5 <213> Bacillus acidopulluliticus

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(829)

10

<400> 8

ES 2 542 353 T3

Asp Ser Thr Ser Thr Glu Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp Ser
 1 5 10 15
 Asn Tyr Ala Asn Trp Asp Leu Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val Asn
 20 25 30
 Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Ser Gly Lys Asp Asp Phe Gly Val
 35 40 45
 Lys Ala Asp Val Gln Val Pro Gly Asp Asp Thr Gln Val Gly Leu Ile
 50 55 60
 Val Arg Thr Asn Asp Trp Ser Gln Lys Asn Thr Ser Asp Asp Leu His
 65 70 75 80
 Ile Asp Leu Thr Lys Gly His Glu Ile Trp Ile Val Gln Gly Asp Pro
 85 90 95

ES 2 542 353 T3

Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Thr Pro Lys
 100 105 110
 Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys Leu
 115 120 125
 Thr Asn Pro Met Thr Leu Ser Asp Gly Ser Ser Gly Phe Thr Val Thr
 130 135 140
 Asp Lys Thr Thr Gly Glu Gln Ile Pro Val Thr Ala Ala Thr Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Ser Ala Ser Ser Ser Glu Gln Thr Asp Leu Val Gln Leu Thr Leu
 165 170 175
 Ala Ser Ala Pro Asp Val Ser His Thr Ile Gln Val Gly Ala Ala Gly
 180 185 190
 Tyr Glu Ala Val Asn Leu Ile Pro Arg Asn Val Leu Asn Leu Pro Arg
 195 200 205
 Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asn Asp Leu Gly Asn Val Tyr Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Thr Ala Phe Arg Val Trp Ala Pro Thr Ala Ser Asp Val Gln Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Tyr Asn Ser Glu Thr Gly Pro Val Thr Lys Gln Leu Glu Met Gln
 245 250 255
 Lys Ser Asp Asn Gly Thr Trp Lys Leu Lys Val Pro Gly Asn Leu Lys
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Tyr Leu Tyr Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Thr Gln Thr
 275 280 285
 Ala Val Asp Pro Tyr Val Arg Ala Ile Ser Val Asn Ala Thr Arg Gly
 290 295 300
 Met Ile Val Asp Leu Glu Asp Thr Asn Pro Pro Gly Trp Lys Glu Asp
 305 310 315 320
 His Gln Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp Glu Val Ile Tyr Glu Val
 325 330 335
 His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn Ser Gly Met Lys Asn Lys
 340 345 350
 Gly Lys Tyr Leu Ala Phe Thr Glu His Gly Thr Lys Gly Pro Asp Asn
 355 360 365

ES 2 542 353 T3

Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ile Asn Ala Val
370 375 380

Gln Leu Gln Pro Ile Glu Glu Phe Asn Ser Ile Asp Glu Thr Gln Pro
385 390 395 400

Asn Met Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr Asn Val Pro Glu
405 410 415

Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Pro Glu Gly Thr Ala Arg Ile Thr Gln Leu
420 425 430

Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ile His Lys Asp Arg Ile Ala Ile Asn Met
435 440 445

Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asn Val Gly Val Ser Asp Phe Asp
450 455 460

Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Ser Ala Gly Asn Tyr
465 470 475 480

Thr Asn Gly Ser Gly Val Gly Asn Glu Ile Ala Thr Glu Arg Pro Met
485 490 495

Val Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Lys Tyr Trp Val Lys Glu Tyr
500 505 510

His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys Asp
515 520 525

Thr Met Ala Lys Ile Ser Lys Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly Ile
530 535 540

Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser Ser
545 550 555 560

Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys Gly Leu Gly Ile Gly Val
565 570 575

Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp Lys
580 585 590

Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro Asn Gln Val Asn Val Ile
595 600 605

Lys Asn Gly Val Met Gly Ser Ile Ser Asp Phe Thr Ser Ala Pro Ser
610 615 620

Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Met Thr Leu Trp Asp
625 630 635 640

Lys Ile Ser Ala Ser Asn Pro Asn Asp Thr Gln Ala Asp Arg Ile Lys
 645 650 655
 Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Phe Thr Ser Gln Gly Val Pro
 660 665 670
 Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn Asp
 675 680 685
 Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn Gln Phe Asp Trp Ser Arg
 690 695 700
 Lys Ala Gln Phe Glu Asn Val Phe Asp Tyr Tyr Ser Trp Leu Ile His
 705 710 715 720
 Leu Arg Asp Asn His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asp Gln Ile
 725 730 735
 Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Asp Ser Pro Thr Asn Thr Val Ala Phe
 740 745 750
 Glu Leu Lys Asn His Ala Asn His Asp Lys Trp Lys Asn Ile Ile Val
 755 760 765
 Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ala Gln Thr Leu Thr Leu Pro Ser Gly
 770 775 780
 Asn Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asn Gln Val Gly Glu Lys Ser Leu
 785 790 795 800
 Gly His Val Asn Gly Thr Val Glu Val Pro Ala Leu Ser Thr Ile Ile
 805 810 815
 Leu His Gln Gly Thr Ser Glu Asp Val Ile Asp Gln Asn
 820 825

<210> 9

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Thermomyces T. lanuginosus

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(269)

10

<400> 9

ES 2 542 353 T3

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45
 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190
 Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
 195 200 205
 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220
 Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
 245 250 255
 Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265

<210> 10

<211> 269

5 <212> PRT

<213> Thermomyces T. lanuginosus

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(269)

ES 2 542 353 T3

<400> 10

Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
20 25 30

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
35 40 45

Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
50 55 60

Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
65 70 75 80

Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
85 90 95

Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
100 105 110

Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
115 120 125

Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
130 135 140

His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
145 150 155 160

Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
165 170 175

Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
180 185 190

Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
195 200 205

Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
210 215 220

Gly Thr Leu Val Pro Val Arg Arg Arg Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
225 230 235 240

Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
245 250 255

Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
260 265

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción de un mosto de cerveza, comprendiendo:
 - a. obtener un macerado por maceración de una molienda, del cual al menos 70% en peso es(son) cereal(es) no malteado(s) que comprende β -amilasa y del cual menos del 30% peso es(son) cereal(es) malteado(s), a una temperatura en la que enzimas (añadidas) exógenas y la α -amilasa endógena están activas;
 - b. contactar el macerado con enzimas exógenas comprendiendo:
 - i. una α -amilasa,
 - ii. una pululanasa,
 - iii. una proteasa,
 - iv. una β -glucanasa,
 - v. una lipasa, y
 - vi. una xilanasa;
 - c. fin de la maceración y filtración del macerado para obtener el mosto.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde la molienda comprende al menos 75% en peso de cereal(es) no malteado(s).
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde el(los) cereal(s) no malteado(s) son cebada, espelta, trigo, centeno, maíz, avena o arroz o cualquier mezcla de los mismos.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde el cereal no malteado es cebada.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molienda comprende además otras fuentes de carbohidratos tales como, jarabes de elaboración de cerveza.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las enzimas exógenas del paso b. en la reivindicación 1 además comprenden una fitasa.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la temperatura de maceración está en una gama que optimiza la β -amilasa.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proteasa está provista por un sistema de enzimas proteolíticas, incluyendo endoproteasas, exopeptidasas o cualquier combinación de las mismas.
9. Proceso según la reivindicación 1, donde la lipasa está provista por una lipasa de Fusarium, Aspergillus o Rhizopus.
10. Uso de un proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la producción de cerveza.

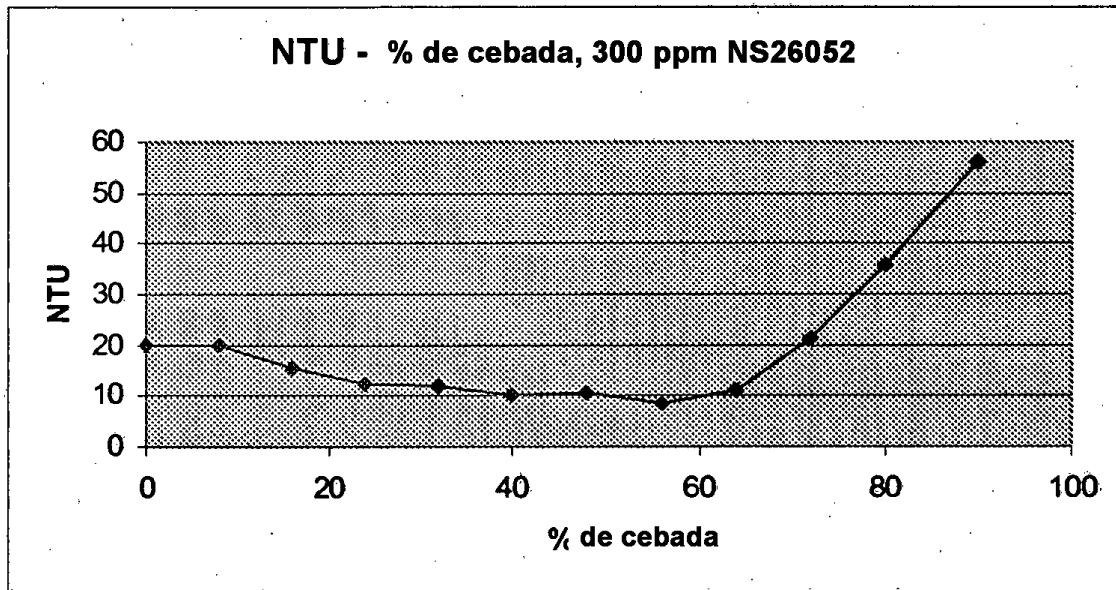


Figura 1

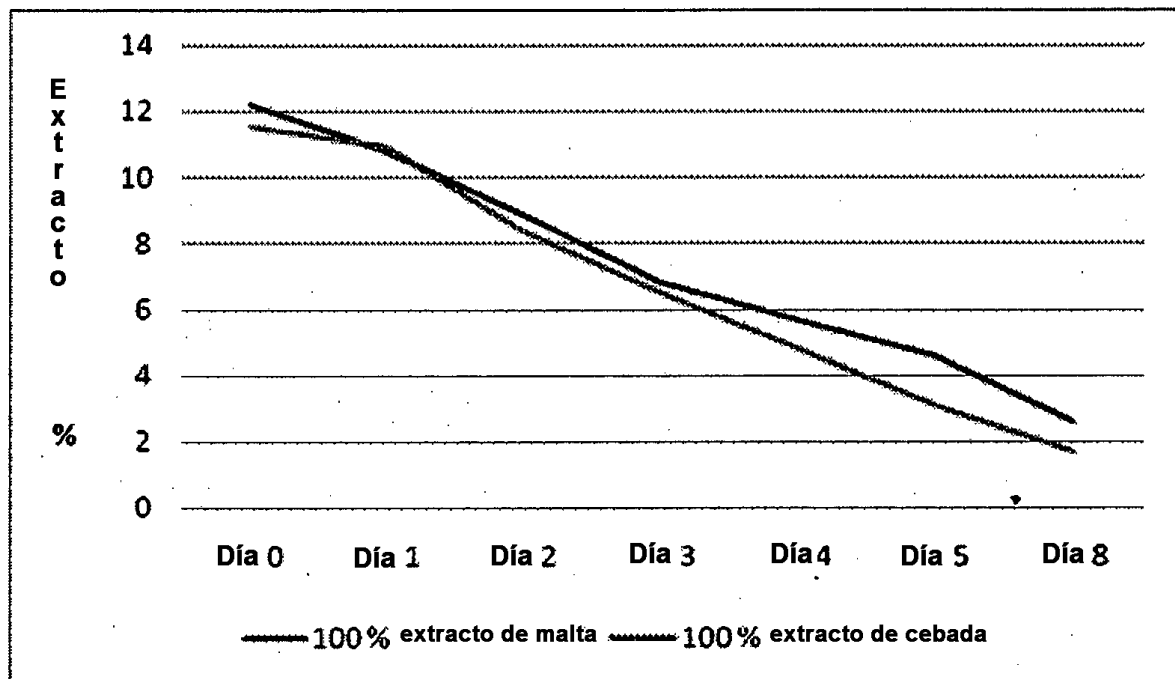


Figura 2